

# Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von MCS-18 in vitro und in vivo im NOD-Mausmodell

---

**Leonie Littmann**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger  
und

aus der Abteilung für Immunmodulation in der Hautklinik der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Steinkasserer

**Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von MCS-18**  
***in vitro* und *in vivo* im NOD-Mausmodell**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
**zur Erlangung des Grades eines**  
**Dr. med. vet.**  
**beim Fachbereich Veterinärmedizin**  
**der Justus-Liebig-Universität Giessen**

eingereicht von

**Leonie Littmann**  
Tierärztin aus Nürnberg

Giessen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan:	Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. Martin Kramer
Gutacher:	Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger
	Prof. Dr. rer. nat. Alexander Steinkasserer

Tag der Disputation: 21.01.2014

***Meinen Eltern***

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Leonie Littmann

## Abkürzungsverzeichnis

AAK	Autoantikörper
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod (activation induced cell death)
Ak	Antikörper
Akz.	Aktenzeichen
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BM-DZ	aus Knochenmark gereifte DZ (bone marrow derived DZ)
BSA	bovine serum albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocyte)
DAPI	4'6-Diamidin-2'-Phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ds	doppelsträngig (double stranded)
DZ	dendritische Zelle
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot assay
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	forkhead box P3

FPZ	Franz-Penzolt-Zentrum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GAD	Glutamatdecarboxylase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
HLA	human leukocyte antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IAA	Insulin-Autoantikörper
IA2	Proteintyrosinphosphatase IA2
ICA	Inselzellantikörper
Idd1	insulin dependent diabetes 1
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked
i.p.	intra-peritoneal
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zelle
IVC	individually ventilated cages
LAG3	lymphocyte-activation gene 3
IDZ	lymphoide DZ
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffkomplex (membrane attack complex)
MACS	magnetische Zellsortierung (magnetic activated cell sorting)
MBL	Mannose bindendes Lektin
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
MCS	makrozyklische Carbon Suboxide
mDZ	myeloide DZ
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MHCI	MHC Klasse 1
MHCII	MHC Klasse 2



Min	Minuten
MIP-1	macrophage inflammatory protein 1
ml	Milliliter
MLR	gemischte Leukozyten-Reaktion (mixed leucocyte reaction)
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
n	Anzahl
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NOD	nicht-adipös diabetisch (non-obese diabetic)
NRP-A7	mimotopes NRP- Antigen mit der Aminosäuresequenz: KYNKANAFI
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannte
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pDZ	plasmazytoide DZ
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyllprotein
PI	Propidiumjodid
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PLN	pankreatischer Lymphknoten
PRR	pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	reverse Transkription
RTQ-PCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
Sek	Sekunden
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
Std	Stunden

Tab.	Tabelle
T1D	Typ 1 Diabetes
Teff	T-Effektorzelle
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
Th-Zelle	T-Helferzelle
Th1	T-Helfer Typ 1
Th2	T-Helfer Typ 2
Th3	T-Helfer Typ 3
Th17	T-Helfer Typ 17
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor beta
Treg	regulatorische T-Zelle
Tr1	adaptive regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
vs	<i>versus</i> (lat.: gegen)
w/v	weight in volume
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2	Das erworbene (adaptive) Immunsystem .....	3
1.1.2.1	T-Lymphozyten.....	3
1.1.2.2	B-Lymphozyten.....	6
1.2	Dendritische Zellen und ihre Reifung.....	7
1.3	Aktivierung der T-Effektorzellen.....	11
1.4	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	12
1.5	Toleranz .....	17
1.6	Autoimmunität.....	18
1.7	<i>Diabetes mellitus</i> .....	18
1.8	<i>Diabetes</i> vom Typ 1.....	19
1.9	Die NOD-Maus: Modellsystem für humanen T1D.....	21
1.10	MCS-18 .....	22
1.11	Ziele der wissenschaftlichen Arbeit .....	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1	Tiere .....	26
2.1.1	Verwendete Mausstämme .....	26
2.1.2	Genehmigung der Tierversuche .....	26
2.1.3	Zucht und Haltung der NOD-Mäuse.....	26
2.1.4	Haltung der C57BL/6- und BALB/C-Mäuse.....	27
2.2	Material.....	27
2.2.1	Geräte.....	28
2.2.2	Verbrauchsmaterial.....	29
2.2.3	Gebrauchsmaterial.....	30
2.2.4	Medien und Puffer.....	31
2.2.5	Verwendete Computerprogramme.....	32
2.2.6	Chemikalien und Reagenzien .....	33

2.2.7	Spezielle Reagenzien .....	33
2.2.7.1	DZ-Reifungsstimuli und Zytokine .....	33
2.2.7.2	Gebrauchsfertige Kits .....	34
2.2.7.3	Antikörper für den Elispot-Assay .....	35
2.2.7.4	Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	35
2.2.7.5	Antikörper für die Isotypkontrollen .....	36
2.2.7.6	Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	37
2.2.7.7	Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	37
2.2.7.8	Fluorophore für die Immunfluoreszenzfärbung .....	37
2.2.7.9	Primer .....	38
2.2.7.10	Autoantigene .....	38
2.3	Methoden .....	38
2.3.1	Zellkulturmethoden .....	38
2.3.1.1	Kultivierung der Zellen .....	38
2.3.1.2	Zellzählung .....	39
2.3.1.3	Gewinnung von murinem GM-CSF Zellkulturüberstand .....	39
2.3.1.4	Knochenmarkspräparation für DZ-Gewinnung .....	40
2.3.1.5	Gewinnung muriner DZ aus dem Knochenmark.....	40
2.3.2	MCS-18 Behandlung <i>in vivo</i> im NOD-Mausmodell .....	41
2.3.2.1	Beschreibung des Versuchsablaufs .....	41
2.3.3	Injektionsmethode zur Applikation von MCS-18 .....	42
2.3.4	Bestimmung der Diabetesinzidenz durch Nachweis der Harnglukose ....	43
2.3.5	Organentnahme der euthanasierten Tiere am Versuchsende .....	44
2.3.5.1	Milzpräparation .....	45
2.3.5.2	Lymphknotenpräparation .....	45
2.3.5.3	Isolierung der Leukozyten aus dem Pankreasgewebe .....	46
2.3.6	Immunologische Methoden .....	46
2.3.6.1	Prinzip der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie (FACS) .....	46
2.3.6.2	Extrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle muriner DZ .....	48
2.3.6.3	Intrazelluläre Foxp3-spezifische FACS-Analyse bei isolierten Zellen aus Milz, Pankreas und pankreatischen Lymphknoten .....	49
2.3.6.4	Apoptose-/Nekrosefärbung .....	51
2.3.6.5	Allogene T-Zell Proliferation/mixed leucocyte reaction (MLR) .....	52

2.3.6.6	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) .....	53
2.3.6.7	Elispot-Assay .....	56
2.3.6.8	Cytometric bead array (CBA) .....	59
2.3.6.9	Magnetische Zellsortierung (MACS) zur Isolierung von B-Lymphozyten .....	60
2.3.7	Molekularbiologische Methoden .....	61
2.3.7.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	62
2.3.7.2	Photometrische Bestimmung der RNA - Konzentration .....	62
2.3.7.3	cDNA-Synthese .....	63
2.3.7.4	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) .....	63
2.3.8	Histologische Methoden .....	65
2.3.8.1	Anfertigung der murinen Pankreasgefrierschnitte .....	65
2.3.8.2	Immunhistochemische Analyse der Gefrierschnitte .....	65
2.3.8.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	66
2.3.9	Statistische Analyse .....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
3.1	Einfluss von MCS-18 auf murine DZ von C57BL/6-Mäusen .....	68
3.1.1	MCS-18 inhibiert die Expression DZ-spezifischer Oberflächenmoleküle .....	68
3.1.2	MCS-18 behandelte, TNF- $\alpha$ stimulierte C57BL/6-DZ hemmen konzentrationsabhängig die T-Zell-Proliferation .....	73
3.2	MCS-18 behandelte, LPS stimulierte B-Zellen zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation .....	75
3.2.1	MCS-18 hemmt konzentrationsabhängig die Immunglobulin-Sekretion von LPS-stimulierten B-Zellen .....	76
3.2.2	MCS-18 inhibiert die durch Zytokine hervorgerufene Produktion der Immunglobuline IgG1, IgG2a und IgG2b durch B-Zellen .....	78
3.3	Einfluss von MCS-18 auf murine DZ von NOD-Mäusen .....	83
3.3.1	MCS-18 inhibiert die Expression DZ-spezifischer Reifungsmarker .....	83
3.3.2	MCS-18 behandelte, LPS gereifte DZ von NOD-Mäusen hemmen konzentrationsabhängig die T-Zell-Proliferation .....	85
3.3.3	MCS-18 vermindert die Zytokin-Sekretion in behandelten DZ .....	87
3.4	MCS-18 im NOD-Mausmodell .....	88

3.4.1	Die Diabetesinzidenz sinkt bei MCS-18 behandelten NOD-Mäuse.....	89
3.4.2	Analyse der IFN- $\gamma$ , Foxp3, Insulin 1 und Insulin 2 mRNA Expression des Pankreas mittels RT-PCR .....	90
3.4.3	Die Expression von Foxp3 <sup>+</sup> Zellen in Milz, pankreatischen Lymphknoten (PLN) und Pankreas.....	92
3.4.4	Immunhistologischer Nachweis von CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> und Foxp3 <sup>+</sup> positiven Zellen im Pankreas der NOD-Maus .....	94
3.4.5	Nachweis von Peptid-spezifischen, IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen in der Milz .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
4.1	MCS-18 verhindert die Expression DZ-spezifischer Reifungsmarker .....	98
4.2	Inhibitorische Wirkung von MCS-18 auf murine B-Zellen .....	100
4.3	MCS-18 im NOD-Mausmodell .....	102
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>128</b>
	Wissenschaftliche Originalveröffentlichungen während meines Promotionsstudiums: .....	128
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk von Zellen, humoralen Faktoren und Botenstoffen, welche sich jeweils ergänzen und wechselseitig regulieren. Es dient dem Organismus zur Abwehr von Infektionen und entarteten körpereigenen Zellen. Alle Zellen des Immunsystems stammen von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (Janeway, 2002) und sind vor allem in den lymphatischen Organen vorzufinden. Des Weiteren zirkulieren sie im Blut und können teilweise in alle Gewebe und die Schleimhäute einwandern. Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen wird das Immunsystem in eine angeborene und eine erworbene Teilkomponente unterteilt.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die „erste Linie“ der Abwehr dar und wird auf direktem Weg aktiviert. Die Abwehrmaßnahmen werden auch als unspezifisch bezeichnet, da sie unabhängig von der Natur des jeweiligen Erregers aktiviert werden. Innerhalb von Minuten (Min) z.B. nach einer bakteriellen Infektion werden die eingedrungenen Pathogene durch angeborene Abwehrmechanismen bekämpft. Die Körperoberfläche ist durch Epithelien, die als erste physische Barriere gegen Infektionen dienen, geschützt. Des Weiteren besitzt der Körper auch chemische Barrieren, um sich gegen eingedrungene Krankheitserreger zu behaupten, wie zum Beispiel das antibakterielle Lysozym in der Tränenflüssigkeit und dem Speichel, den niedrigen pH-Wert im Magen oder antibakterielle Peptide im Dünndarm. Werden diese Barrieren durch Erreger überwunden, so müssen sie vom Organismus als fremd erkannt und wirksam bekämpft werden. Phagozyten sind in der Lage, die eingedrungenen Erreger ohne Hilfe der adaptiven Immunantwort zu erkennen,

## Einleitung

aufzunehmen und zu zerstören. Zu den Phagozyten zählen die Monozyten, Makrophagen und Granulozyten.

Ein weiterer Zelltyp des angeborenen Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie spielen eine wichtige Rolle bei Virusinfektionen und der Tumorbekämpfung. Die virusinfizierten und malignen Zellen werden durch NK-Zellen abgetötet. Durch die Freisetzung des Inhalts zytotoxischer Granula wird in der Zielzelle die Apoptose ausgelöst. Apoptose wird auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet und ist im Unterschied zur Nekrose ein genetisch regulierter Vorgang (Haanen and Vermes, 1995). Im Rahmen der Apoptose wird ein zelleigenes Zerstörungsprogramm aktiviert, bei welchem die Kern-DNA abgebaut wird und es zu einer Degeneration und Kondensation des Zellkerns kommt (Alison and Sarraf, 1992; Walker *et al.*, 1988). Zudem sezernieren NK-Zellen proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (Tab.2) oder macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1) (Backstrom *et al.*, 2004; Robertson, 2002).

Eine bedeutende humorale Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, welches aus über 30 Plasmaproteinen (Walport, 2001) und – im Komplex – auch Proteasen besteht. Es dient der Abwehr bakterieller Infektionen, stellt eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar (Walport, 2001) und übernimmt eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Immunkomplexen (Schifferli *et al.*, 1986) sowie von apoptotischen Zellen (Galvan *et al.*, 2012). Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei unterschiedliche Wege erfolgen: den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg (Sprong *et al.*, 2004). Nach der Bildung des Antigen-Antikörper Komplexes beginnt der klassische Weg der Komplementaktivierung (Dodds *et al.*, 1978). Sowohl der alternative Weg als auch der Lektin-Weg sind Antikörper-unabhängig. Letzterer wird durch Mannose bindendes Lektin (MBL) aktiviert (Sato *et al.*, 1994), wobei der alternative Weg spontan durch die Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b in Gang gesetzt wird. Allen drei Wegen gemeinsam schließt sich die Aktivierung des



## Einleitung

Komplementfaktors C3 zu C3b an (Muller-Eberhard, 1988). Bakterien, welche mit C3b markiert sind, werden von Phagozyten erkannt (Opsonierung) und phagozytiert (Walport, 2001). Zudem kann diesen drei Aktivierungswegen der terminale Weg, der mit der Ausbildung des Membranangriffskomplexes (MAC, membrane attack complex) endet, angeschlossen sein. Hierbei kommt es durch die Komplementproteine C5b-C9 in der Zellmembran des Erregers zur Porenbildung (Esser, 1991), was schlussendlich zur direkten Zerstörung durch osmotische Lyse führt (Amiguet *et al.*, 1985; Podack and Tschopp, 1984). Darüber hinaus wird durch die Komplementkomponenten C3a, C4a und C5a eine Entzündungsreaktion ausgelöst und so werden weitere inflammatorische Zellen wie Phagozyten und Monozyten angelockt und aktiviert (Gorski *et al.*, 1979).

### 1.1.2 Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem hoch spezifisch und weist zwei Effektorsysteme auf: die zelluläre Abwehr, die über T-Zellen vermittelt wird, und die humorale Abwehr, die durch B-Zellen vermittelt wird.

#### 1.1.2.1 T-Lymphozyten

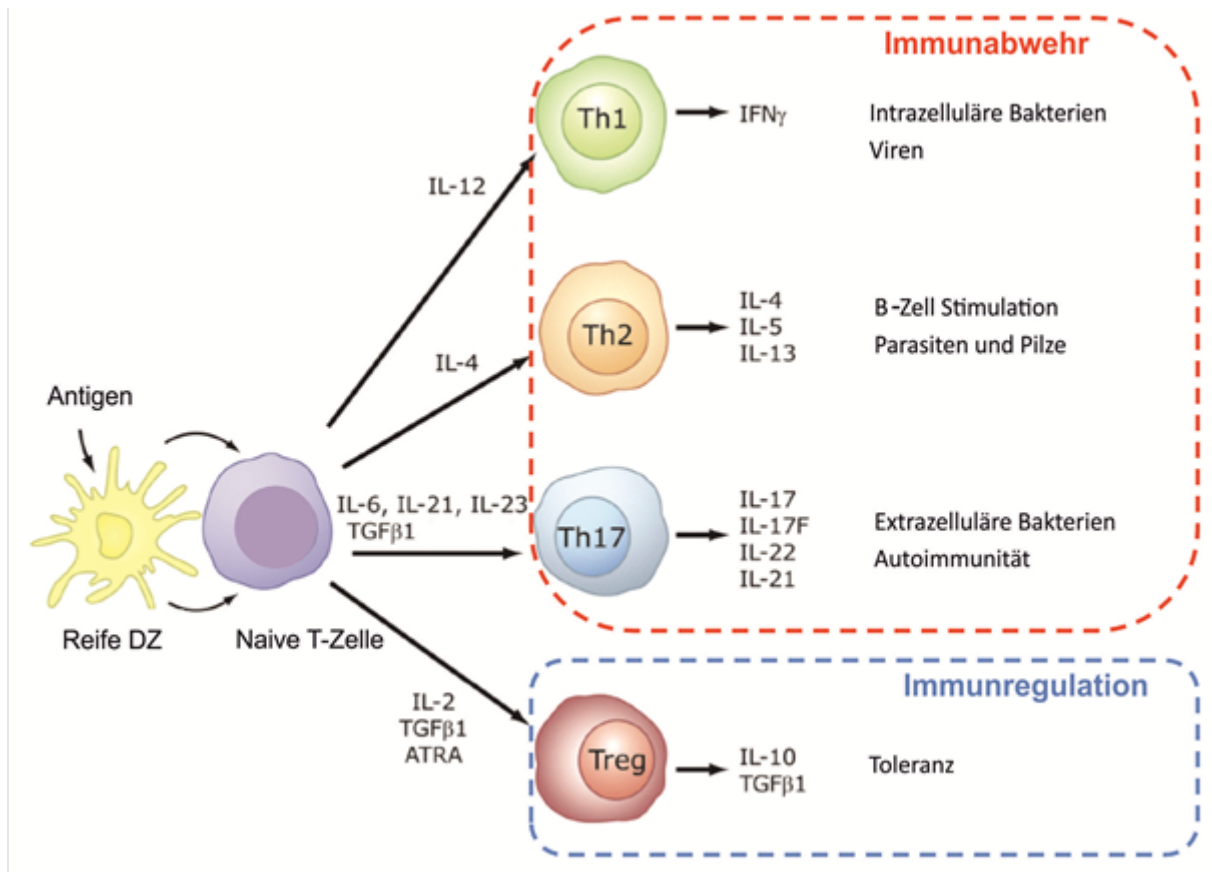
Die spezifische zelluläre Immunantwort wird durch die T-Zellen vermittelt. Sie entwickeln sich im Thymus aus einer aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzelle. Jeder T-Lymphozyt trägt auf der Zelloberfläche einen einzigartigen T-Zell-Rezeptor (TZR) (Keegan and Paul, 1992), der in der Lage ist, genau ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Damit die Antigene von den T-Zellen erkannt werden können, müssen diese eingelagert bzw. assoziiert mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHCI) oder Klasse II (MHCII) präsentiert werden (Germain, 1994). Alle kernhaltigen Zellen eines Individuums exprimieren identische MHCI-Moleküle im Rahmen der „Selbst“-Erkennung des adaptiven Immunsystems (Weenink and Gautam, 1997). Zusätzlich exprimieren

## Einleitung

antigenpräsentierende Zellen (APZ), zu welchen Makrophagen, B-Zellen sowie dendritische Zellen (DZ) zählen, membran-identische MHCII-Moleküle. Das durch APZ präsentierte Antigen wird mit Hilfe des TZR sowie der Korezeptoren CD4 oder CD8 entsprechender T-Zellen erkannt (Tab. 1). Dieser Kontakt zwischen APZ und T-Zelle wird auch als immunologische Synapse bezeichnet (Grakoui *et al.*, 1999). Bis heute sind vier spezialisierte Subtypen von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th-Zelle) bekannt, welche als Th1-, Th2-, Th17-Zellen sowie regulatorische T-Zellen bezeichnet werden (Abb. 1) (Zhu and Paul, 2010). T-Helferzellen exprimieren CD4 als Korezeptor, erkennen ausschließlich die auf MHCII-Molekülen präsentierten Antigene und differenzieren anschließend zu den o.g. vier Subtypen aus (Doyle and Strominger, 1987). Die Ausdifferenzierung von Th1-Zellen führt zur Stärkung der zellulären Immunantwort (O'Garra and Murphy, 1996; O'Garra and Murphy, 2009). Die Th1-spezifische bzw. zelluläre Immunantwort ist hauptsächlich gegen endozytotisch von extrazellulär aufgenommene und enzymatisch attackierte Erreger gerichtet. Das von aktivierten dendritischen Zellen (DZ) sezernierte Interleukin 12 (IL-12) führt u.a. zur Ausdifferenzierung einer Th1-Zelle, welche sich wiederum durch die Produktion der Interleukine IL-12, IL-2, von IFN- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor beta (TNF- $\beta$ ) (Tab.2) auszeichnet, um Makrophagen und NK-Zellen zu stimulieren (Macatonia *et al.*, 1995). Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort und sind verantwortlich für Immunantworten gegen parasitäre Infektionen und im Rahmen des allergischen Asthmas. (Lambrecht *et al.*, 2001; MacDonald and Maizels, 2008). Die humorale Antwort ist gegen extrazelluläre Erreger gerichtet und führt so die durch B-Zellen hervorgerufene, antikörperabhängige Immunreaktion herbei. Die Ausdifferenzierung zur Th2-Zelle erfolgt in Gegenwart von IL-4. Differenzierte Th2-Zellen sezernieren die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 (Koyasu and Moro, 2011). IL-4 fördert die Proliferation und anschließende Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen. IL-5 und IL-13 aktivieren eosinophile sowie basophile Granulozyten (MacDonald and Maizels, 2008; Moser and Murphy, 2000). Die Th1- und Th2-Immunantworten beeinflussen sich wechselseitig, indem das von

## Einleitung

Th1-Zellen sezernierte IL-12 die Th2-Immunantwort unterdrückt und IL-4 der Th2-Zellen die Th1-Immunantwort inhibiert (Kidd, 2003).



**Abb. 1: T-Zell Differenzierung nach Antigenpräsentation.** Durch die Interaktion zwischen dendritischer Zelle (DZ) und naiver T-Zelle differenzieren sich die naiven T-Zellen zu einer der verschiedenen T-Helferzell-Typen (Th-Zellen: Th1-, Th2-, Th17- und regulatorischen T-Zelle) aus. Diese verschiedenen Subpopulationen variieren in ihrem Zytokinprofil und ihrer Effektorfunktion. Th1-Zellen differenzieren sich in Anwesenheit von Interleukin 12 (IL-12) aus und sezernieren Interferon gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ). Sie sind beteiligt an der zellulären Immunität gegen intrazelluläre Mikroorganismen. In Gegenwart von Interleukin 4 (IL-4) kommt es zur Ausdifferenzierung von Th2-Zellen, welche die Interleukine IL-4, IL-5 sowie IL-13 sezernieren. An der Entwicklung von Th17-Zellen sind die Interleukine IL-6, IL-21 und IL-23 sowie der transforming growth factor beta ( $\text{TGF-}\beta 1$ ) beteiligt. Diese Zellen sekretieren die Interleukine IL-17, IL-17F, IL-22 und IL-21, welche eine wichtige Rolle in der Beseitigung von extrazellulären Bakterien spielen. In Anwesenheit von IL-2,  $\text{TGF-}\beta 1$  und All-trans-Retinsäure (ATRA) differenzieren sich aus der naiven T-Zelle IL-10 und  $\text{TGF-}\beta 1$  sekretierende, regulatorische T-Zellen aus. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. (Abb. modifiziert nach Jetten, 2009)

## Einleitung

In Anwesenheit von IL-2 und transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) bilden sich die regulatorischen T-Zellen aus (Yoshimura *et al.*, 2010), die wichtig zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind (Piccirillo and Shevach, 2004) (s. Kap. 1.4). Ein weiterer Subtyp sind die Th17-Zellen, die sich unter Einwirkung des Interleukins IL-6 und des TGF- $\beta$  entwickeln (Jetten, 2009; Kimura and Kishimoto, 2011). Diese Zellen treten vor allem bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Rheumathoider Arthritis und Asthma auf. Sie sind in der Lage, die Interleukine IL-17A und IL-17F zu produzieren (Liang *et al.*, 2006). Durch diese Interleukine werden insbesondere neutrophile Granulozyten rekrutiert (Laan *et al.*, 1999; Matsushita and Higashi, 2008); zudem spielt IL-17F eine wichtige Rolle bei chronischen und allergischen Entzündungen in der Lunge (Yang *et al.*, 2008).

Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet. Sie tragen CD8 als Korezeptor und erkennen Antigene, welche durch MHC-I-Moleküle präsentiert werden (Norment *et al.*, 1988). Die Eliminierung der virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen erfolgt über die CTL-induzierte Einleitung der Apoptose. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren, nach der Erkennung von Antigenen auf der Zielzelle, lytische Granula, die die zytotoxischen Proteine Perforin und Granzyme enthalten. Das Perforin bildet eine Pore in der Membran der Zielzelle und die Granzyme lösen die Apoptose der Zielzelle aus (Berke, 1995).

### 1.1.2.2 B-Lymphozyten

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark und können durch die Expression von B-Zell-Rezeptoren (BZR) extrazelluläre Antigene erkennen und an diese binden (Reth, 1992). Nach der Bindung eines Antigens differenziert sich die B-Zelle direkt zur antikörperproduzierenden Plasmazelle (Tarlinton *et al.*, 2008). Ein kleiner Anteil der B-Zellpopulation wandelt sich bei dieser Differenzierung in B-Gedächtniszellen um, die bei erneutem Antigenkontakt schnell aktiviert werden können (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007).

## Einleitung

Ein weiterer Weg, die B-Zelle zu stimulieren, erfolgt in direkter Zusammenarbeit mit einer Th2-Zelle. Hierbei wird das Antigen in die B-Zelle per Phagozytose aufgenommen und jeweils ein niedermolekulares Peptidfragment des Antigens über das MHCII-Molekül an der B-Zelloberfläche den CD4+ Th2- Zellen präsentiert. Durch die von den CD4+ Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, welche die B-Zelle stimulieren (Abb. 1), wird diese zur Produktion antigenspezifischer Immunglobuline veranlasst (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Die von Plasmazellen am rauen endoplasmatischen Retikulum produzierten Immunglobuline, auch Antikörper genannt, sind dann in der Lage, nach zellulärer Freisetzung die jeweils spezifische Antigenstruktur zu erkennen und diese zu binden. Immunglobulinmoleküle haben eine Y-förmige Grundstruktur, welche sich aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten zusammensetzt. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden, und jede schwere Kette ist durch eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette verknüpft. Am N-Terminus jeder schweren und leichten Kette befindet sich jeweils eine hochvariable Region, welche zusammen die Antigenbindungsstelle bilden (= Fab-Fragment). Am C-Terminus der schweren Ketten (= Fc-Fragment) befindet sich eine Bindungsstelle für Komponenten (C1q, C1r, C1s) des Komplementsystems. Die fünf Hauptformen der Immunglobuline sind IgM, IgG, IgD, IgA und IgE. Beim Menschen sind noch die Unterklassen IgA1 und IgA2 sowie IgG1-4 bekannt (Schroeder, Jr. and Cavacini, 2010). Bei Mäusen unterscheidet man noch die Unterklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (Sell et al., 1970). Durch die Antigen-Antikörper Bindung kann es direkt zur Inaktivierung der Antigene kommen, die Phagozytose wird erleichtert, und die Aktivierung des Komplementsystems wird eingeleitet (Roost et al., 1995; Spycher et al., 1991).

## 1.2 Dendritische Zellen und ihre Reifung

Im Jahre 1973 wurden dendritische Zellen (DZ) erstmals von Steinman und Cohn beschrieben. Die bis dahin unbekannte Zellart wurde aus der Milz von Mäusen isoliert und fiel durch ihre besondere Morphologie auf. Die langen zytoplasmatischen

## Einleitung

Zellausläufer verleihen den DZ ihre typische baumartige Gestalt (griech. *dendron* = Baum, lat. *dendriticus* = verzweigt). Ralph Steinman wurde 2011 für seine Entdeckung posthum mit dem Medizin-Nobelpreis geehrt. Die von Paul Langerhans schon früher (1886) in der Epidermis entdeckten Zellen (Langerhans-Zellen) stellen nach heutigem Wissen eine Subpopulation der DZ dar (Schuler and Steinman, 1985). DZ nehmen eine zentrale Rolle in der Immunantwort ein. Sie stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (Fujii *et al.*, 2004; Steinman and Young, 1991). DZ gehören wie B-Zellen, Monozyten und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und sind entscheidend für die adaptive Immunantwort. Sie nehmen pathogene Erreger und apoptotisches Zellmaterial mittels Phagozytose (Inaba *et al.*, 1993), Makropinozytose (Sallusto *et al.*, 1995) oder rezeptorvermittelt durch Endozytose in den peripheren Organen auf (Thery and Amigorena, 2001). Anschließend wandern die DZ in die nächstgelegenen Lymphorgane und präsentieren dort den T- und B-Zellen die peptidergen Antigene mit Hilfe der MHCII-Moleküle (Qi *et al.*, 2006; Schuurhuis *et al.*, 2006). DZ sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen und nur sie können naive T-Zellen aktivieren (Steinman and Hemmi, 2006). Sie entwickeln sich im Knochenmark aus einer CD34 positiven Vorläuferzelle (Liu, 2001), wobei die Ausdifferenzierung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle in die verschiedenen DZ-Subtypen durch den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert wird (Wu and Liu, 2007). Ursprünglich wurden die aus der Milz isolierten DZ in CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> Zellen eingeteilt (Tab. 1) (Shortman, 2000). Es wurde angenommen, dass sich die CD8α<sup>+</sup> Subpopulation ausschließlich aus lymphatischen Vorläuferzellen entwickelt. Dieser DZ-Subtyp wurde als lymphoide DZ (IDZ) bezeichnet, wohingegen sich die CD8α<sup>-</sup> Zellen nur aus myeloischen Vorläuferzellen differenzieren und deshalb myeloide DZ (mDZ) genannt wurden. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich sowohl die lymphatischen als auch die myeloischen Vorläuferzellen in alle DZ-Subtypen ausdifferenzieren können (Manz *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Lymphoide DZ sind in der Lage, große Mengen an IL-12 zu produzieren, und sie induzieren vorzugsweise eine Th1-Immunantwort (Moser and

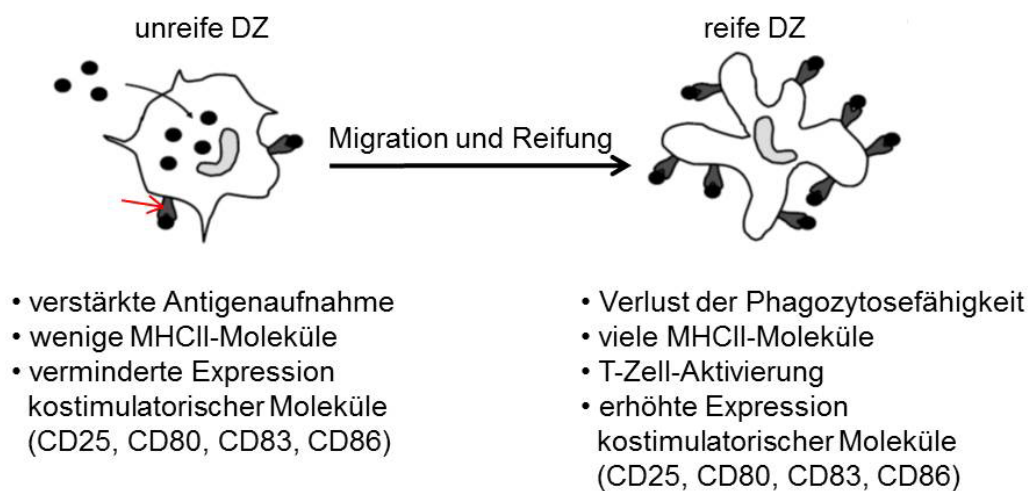
## Einleitung

Murphy 2000). Myeloischen DZ hingegen fehlt die Fähigkeit, IL-12 zu produzieren, und sie induzieren eine Th2-Immunantwort (Pulendran *et al.*, 2001). Neben den CD8 $\alpha^+$  und CD8 $\alpha^-$  DZ-Subtypen ist noch eine dritte Subpopulation identifiziert worden, die plasmazytoiden DZ (pDZ). Diese pDZ sind kleiner als mDZ und sie exprimieren CD11c und CD8 $\alpha$  in nur geringem Maß. Nach einem viralen oder bakteriellen Stimulus sekretierten pDZ IFN- $\gamma$  und exprimieren die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 (Tab. 1) (Asselin-Paturel *et al.*, 2001). Im Blut sowie in den peripheren und lymphatischen Organen sind DZ in einem unreifen Stadium vorzufinden. In diesem Stadium zeichnen sie sich durch eine niedrige Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 aus (Mahnke *et al.*, 2002). Sie sind nicht in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu sekretieren (Maldonado and von Andrian, 2010), und es fehlt ihnen auch die bei reifen DZ typische sternförmige Gestalt. (Banchereau and Steinman, 1998). Diese unreifen DZ sind auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert, können aber auf Grund ihrer funktionellen Eigenschaften T-Zellen nicht effektiv aktivieren (Tang and Bluestone, 2008).

Die Reifung der DZ zu T-Zell-aktivierenden DZ wird durch pathogen-associated molecular patterns (PAMP) ausgelöst, die über die sog. pattern recognition receptors (PRR) erkannt werden (Reis e Sousa, 2004). Zu den PAMPs zählen Flagellin und Lipoprotein bakterieller Herkunft, wie auch membranständiges Lipopolysaccharid (LPS), virale RNA sowie Beta-Glucan aus Pilzen (Medzhitov, 2001). Nach Aufnahme der Antigene migrieren die DZ innerhalb der lymphatischen Gefäße zu den drainierenden lymphoiden Organen, wobei es zur Reifung und zu phänotypischen sowie funktionellen Veränderungen der DZ kommt. Es erfolgt ein grundlegender Wandel von einer ruhenden, phagozytierenden zu einer migrierenden, antigenpräsentierenden Zelle (Banchereau *et al.*, 2000). Die reifen DZ sind charakterisiert durch eine verstärkte Expression der MHCII-Moleküle (Inaba *et al.*, 2000), durch CD83 (Zhou and Tedder, 1996) sowie durch kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 bzw. CD40 (Caux *et al.*, 1994; Inaba *et al.*, 1994). Außerdem verlieren sie ihre Phagozytosefähigkeit (Banchereau and Steinman, 1998) und

## Einleitung

zeichnen sich durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen aus (Abb. 2) (Steinman *et al.*, 2003). Nur vollständig ausgereifte DZ sind in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren; sie werden daher als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems beschrieben (Adams *et al.*, 2005).



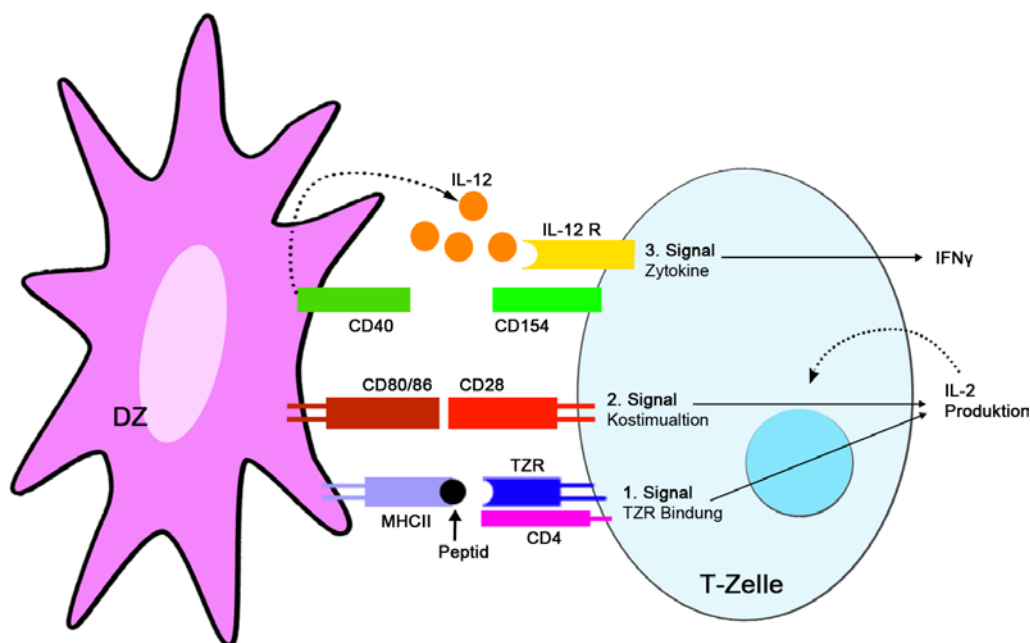
**Abb. 2: Morphologische und phänotypische Veränderung dendritischer Zellen während ihrer Reifung.** Antigene sind als schwarze Kugeln dargestellt. Der rote Pfeil zeigt auf das MHCII-Molekül mit gebundenem (präsentiertem) Antigen. Verwendete Abkürzungen: CD: cluster of differentiation, DZ: dendritische Zellen, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex

Neben den unreifen und reifen DZ nehmen die semireifen DZ ein Zwischenstadium in der DZ-Reifung ein. Charakteristisch für semireife DZ ist eine hohe Expression von MHCII-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 (Tab. 1). Die Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine zu produzieren, um eine effektive T-Zell-Stimulation hervorzurufen, fehlt diesem Zelltyp jedoch (Lutz and Schuler, 2002). Semireife DZ können *in vitro* durch die Stimulation unreifer DZ mit TNF- $\alpha$  generiert werden. Bei Mäusen konnte durch die intravenöse Verabreichung dieser *in vitro* generierten semireifen DZ ein Schutz vor den Symptomen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) beobachtet werden (Menges *et al.*, 2002).



### 1.3 Aktivierung der T-Effektorzellen

Die migrierten reifen DZ präsentieren in den T-Zell-Arealen der lymphatischen Organe ihre Antigene auf MHC-Molekülen den T-Zellen, welche sich anschließend zu T-Effektorzellen entwickeln. Um eine antigenspezifische Zellantwort zu erhalten, werden T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) aktiviert, wozu kostimulatorische Signale sowie bestimmte Zytokine benötigt werden. Sind diese kostimulatorischen Moleküle nicht vorhanden, können die T-Zellen nicht vollständig aktiviert werden oder sie werden anerg (inaktiv). Anerge T-Zellen produzieren kein IL-2 und können nicht zu antigenspezifischen Effektorzellen ausdifferenzieren. Die auf reifen DZ exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 binden an das Oberflächenprotein CD28 der T-Zelle und regen so die T-Zelle zur Produktion von IL-2 an (Abb. 3).



**Abb. 3: Interaktion zwischen T-Zelle und Dendritischer Zelle.** Die Aktivierung der T-Zelle und der daraus resultierenden Th1-Immunantwort erfolgt über die Bindung spezifischer Oberflächenmoleküle. Der T-Zell-Rezeptor (TZR) bindet zusammen mit CD4 an den MHCII-Peptid-Komplex. Durch die Bindung von CD28 an CD80 bzw. CD86 wird in der T-Zelle die Sekretion von IL-2 ausgelöst. Durch die CD40-CD154 Interaktion kommt es zu einer vermehrten IL-12 Sekretion in der dendritischen Zelle. IL-12 wird über den IL-12 Rezeptor (IL-12R) der T-Zelle gebunden und bedingt die Freisetzung von Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). (Abb. modifiziert nach Coates et al., 2002)

## Einleitung

IL-2 ist wichtig für die klonale Expansion der T-Zellen (Steinman *et al.*, 1999). Der CD40 Ligand (CD40L) CD154 wird nach der Aktivierung der T-Zellen exprimiert und bindet an das auf den DZ exprimierte CD40 (Tab. 1). Diese Interaktion führt zu einer vermehrten IL-12 Produktion durch die DZ (Coates *et al.*, 2002). Durch dieses Signal nimmt die Expression von kostimulatorischen Molekülen weiter zu, und die Immunantwort wird somit verstärkt.

DZ sind in der Lage, eine Th1- oder Th2- Immunantwort hervorzurufen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-12 bevorzugt zu Th1-Zellen. Bei Fehlen von IL-12 oder vermindert exprimierten kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, CD40) kommt es entweder zur Ausdifferenzierung von Th2-Zellen oder die Zellen werden anerg (Jonuleit *et al.*, 2001; Roncarolo and Levings, 2000)

### 1.4 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen (Treg) wurden erstmalig von Sakaguchi *et al.* (1996) beschrieben. Diese Forschergruppe fand heraus, dass thymektomierte Mäuse eine drastisch verminderte Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen (Asano *et al.*, 1996; Sakaguchi *et al.*, 1996). Zudem konnte bei drei Tage alten Mäusen gezeigt werden, dass diese nach einer Thymektomie an einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen litten (Taguchi *et al.*, 1980; Taguchi *et al.*, 1985). Der Grund dafür war das Fehlen der regulatorischen T-Zellen, deren Populationsgröße erst nach drei Wochen vollständig entwickelt ist.

Die natürlich vorkommenden regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die auch den Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (Foxp3) exprimieren, machen 5-10% der in peripheren und lymphoiden Organen vorhandenen T-Zellen aus. Sie entwickeln sich im Thymus als eine eigenständige T-Zell Subpopulation (Itoh *et al.*, 1999; Seddon and Mason, 2000). Die Ausdifferenzierung einer T-Zelle zu einer Treg wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 gesteuert. Eine Mutation im Foxp3-Gen konnte erstmals in der „scurfy“ Maus nachgewiesen werden (Ziegler, 2006). Männliche Tiere im Alter von 3-4 Wochen wiesen eine Überproliferation der

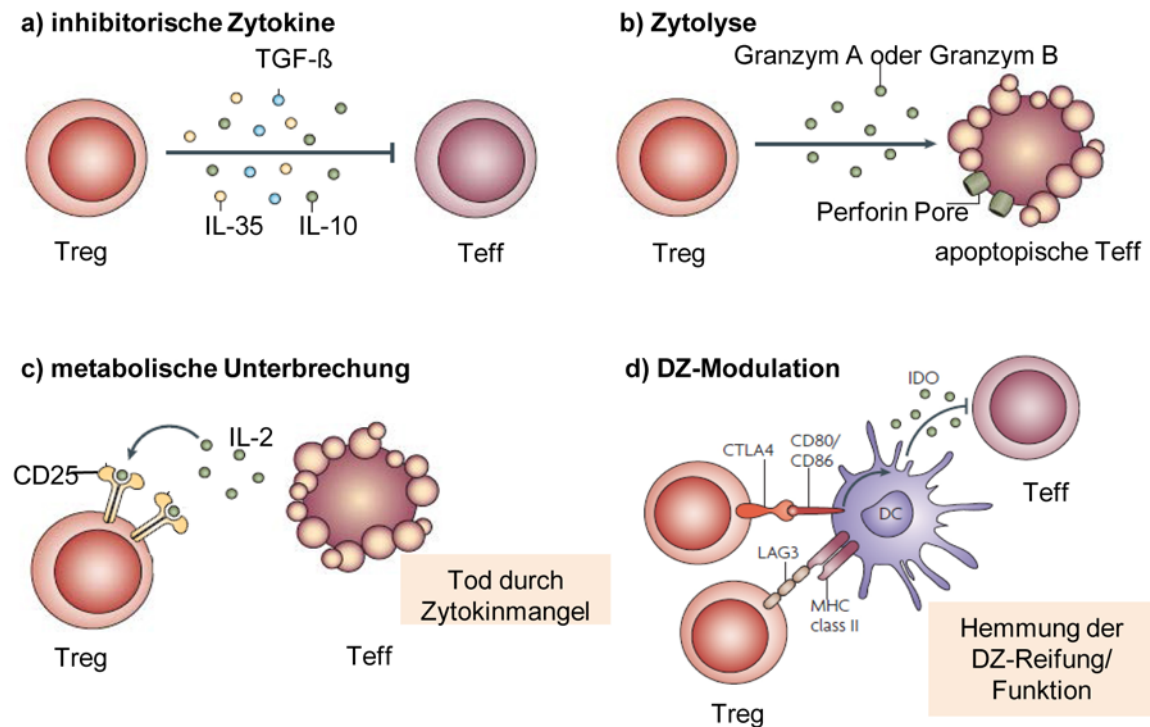
## Einleitung

CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie eine Überproduktion an proinflammatorischen Zytokinen auf und verstarben (Brunkow *et al.*, 2001). Beim Menschen führen Mutationen im Foxp3-Gen zum sog. immunedysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy x-linked-syndrom (IPEX-Syndrom). Dieses Syndrom wird x-chromosomal vererbt und gehört zur Gruppe der Autoimmun-Enteropathien (Bennett and Ochs, 2001; Chatila *et al.*, 2000; Wildin *et al.*, 2001). Menschen mit dieser genetischen Mutation leiden an einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen (Bennett and Ochs, 2001; Wildin *et al.*, 2001). Neben natürlichen Treg sind noch drei weitere Subtypen, nämlich induzierbare regulatorische T-Zellen (iTregs) sowie Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) und T-Helferzellen Typ3 (Th3-Zellen) bekannt (Bettelli *et al.*, 2007). *In vitro* können Tr1-Zellen durch die Zytokine IL-10/IFN- $\gamma$  oder IL-10/IL-4 generiert werden (Levings *et al.*, 2002). Die Differenzierung der unterschiedlichen Subtypen von regulatorischen T-Zellen erfolgt durch spezifische Zytokine und Transkriptionsfaktoren (Wan and Flavell 2006). Jeder dieser Subtypen zeichnet sich durch spezialisierte Funktionscharakteristika aus. Tr1-Zellen zum Beispiel sind hauptsächlich in der Darmschleimhaut zu finden, wo sie Immunantworten gegen körpereigene Antigene supprimieren. Sie exprimieren kein Foxp3, zeichnen sich aber durch eine erhöhte Expression von IL-10 und TGF- $\beta$  aus. Th3-Zellen werden nach oraler Aufnahme von Fremdanitgen gebildet und spielen eine wichtige Rolle bei der oralen Toleranzentwicklung (Wan and Flavell, 2006). Sie exprimieren Foxp3 und TGF- $\beta$  (Taams and Akbar, 2005).

Regulatorische T-Zellen inhibieren die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), sowie B-Zellen und dendritischen Zellen (von Boehmer, 2005). Ihrem Wirkungsmechanismus entsprechend können die Treg in vier Gruppen eingeteilt werden: Suppression durch inhibitorische Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-10 sowie IL-35 (Joetham *et al.*, 2007), Suppression durch Zytolyse (Grossman *et al.*, 2004), Suppression durch Unterbrechung des Metabolismus der T-Effektorzellen (de la Rosa *et al.*, 2004) und Suppression durch Modulation von DZ-Reifung und -Funktion (Paust *et al.*, 2004;

## Einleitung

Vignali *et al.*, 2008) (Abb. 4). Die suppressiven Eigenschaften der Treg ermöglichen es dem Immunsystem, autoimmune Geschehen in der Peripherie einzudämmen.



**Abb. 4: 4 suppressive Wirkungsweisen der regulatorischen T-Zellen.** Es kommt zur Hemmung der T-Effektorzelle (Teff) a) durch die Wirkung inhibitorischer Zytokine, wie transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) sowie die Interleukine IL-10 und IL-35 b) durch Zytolyse der T-Effektorzelle (Teff) durch Granzym A, Granzym B und Perforin c) durch metabolische Störung vermittelt durch hochaffine CD25-Moleküle (IL-2 Rezeptor) und daraus resultierendem Zytokinmangel für die T-Effektorzelle (Teff) d) durch Suppression der dendritischen Zell-Reifung (DZ-Reifung) über LAG3- (lymphocyte-activation gene 3) MHCII-Interaktion sowie Synthese des immunsuppressiven Moleküls IDO (Indolamin 2,3-Dioxygenase) der DZ durch die Bindung von CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) an CD80/86. (Abb. modifiziert nach (Vignali *et al.*, 2008).

## Einleitung

CD Antigen	Zelluläre Expression	Funktion
CD4	T-Zellen, Treg, Monozyten, Makrophagen	T-Zell-Aktivierung, MHCII-Korezeptor
CD8α	CTL, NK, DZ	T-Zell- Differenzierung, MHCI-Korezeptor
CD11c	NK, DZ, mDZ, T- und B- Zell Subtypen	Zelladhäsion
CD11b	Granulozyten, Monozyten, NK, T- und B- Zellen, DZ	Zelladhäsion, Chemotaxis, Apoptose
CD25	aktivierte T- und B-Zellen, Monozyten, Treg, DZ	α-Kette des IL-2 Rezeptors
CD28	T-Zellen, Thymozyten, NK	T-Zell-Kostimulation, CD80 und CD86 Rezeptor
CD40	B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DZ	CD 154 Rezeptor, B-Zell-Kostimulation
CD80	aktivierte T- und B-Zellen, Makrophagen, DZ	CD28 und CD152 Rezeptor, Kostimulation für T-Zell- Aktivierung
CD83	reife DZ, aktivierte T-Zellen	Regulation der T-Zell-Antwort
CD86	aktivierte T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DZ	CD28 und CD152 Rezeptor, Kostimulation für T-Zell-Aktivierung
CD95	Thymozyten, aktivierte Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten	Induziert Apoptose
CD152	aktivierte T-Zellen	CD80 und CD86 Rezeptor, negative T-Zell-Stimulation
CD154	Makrophagen, DZ, aktivierte T-Zellen	CD40 Rezeptor, T-Zell-Aktivierung

**Tab. 1: Übersicht über wichtige Differenzierungsantigene in der Plasmamembran immunkompetenter Zellen.** Verwendete Abkürzungen: CD: cluster of differentiation, CTL: zytotoxische T-Lymphozyten, DZ: dendritische Zellen, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, NK: natürliche Killerzellen, Treg: regulatorische T-Zellen.

Zytokin	Produzenten	Funktion
IL-1β	Makrophagen, DZ, Endothelzellen, B-Zellen	proinflammatorisches Zytokin
IL-2	T-Zellen, NK-Zellen	T- und B-Zell-Aktivierung sowie Aktivierung von Monozyten und Granulozyten

## Einleitung

IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zell-Aktivierung, Th2-Aktivierung
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen
IL-6	Makrophagen, T-Zellen, DZ	proinflammatorisches Zytokin, Aktivierung von B-Zellen
IL-10	Makrophagen, T- Zellen, B-Zellen, Monozyten	antiinflammatorisches Zytokin, Inhibition der Zytokinproduktion von Makrophagen und T-Zellen
IL-12	Makrophagen, DZ	Induktion der IFN- $\gamma$ Sekretion von T- und NK-Zellen, Th1-Aktivierung
IL-17	T-Zellen	proinflammatorisches Zytokin
GM-CSF	Monozyten/Makrophagen, T-Zellen	Differenzierungsfaktor für APZ
IFN- $\gamma$	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen, Hochregulation der MHC-Expression
TNF- $\alpha$	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen	proinflammatorisches Zytokin
TNF- $\beta$	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen	Steigerung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen
TGF- $\beta$	T- und B-Zellen	Suppressorfunktion, Inhibierung der Lymphozytenproliferation

**Tab. 2: Übersicht wichtiger Zytokine und deren Funktion.** Verwendete Abkürzungen: APZ: antigenpräsentierende Zellen, DZ: dendritische Zellen, GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor, IFN- $\gamma$ : Interferon gamma, IL: Interleukin, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, NK: natürliche Killerzellen, TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta, TNF- $\alpha$  bzw. TNF- $\beta$ : Tumornekrosefaktor alpha bzw. beta, Treg: regulatorische T-Zellen.

### 1.5 Toleranz

Die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigenes Gewebe von fremden Strukturen zu unterscheiden, wird als Toleranz bezeichnet. Die Ausbildung der immunologischen Toleranz schützt den Organismus vor Autoimmunität, Allergien sowie chronischen Entzündungsgeschehen. Unterschieden wird zwischen der zentralen und peripheren Toleranz.

Die zentrale Toleranzentwicklung erfolgt als negatives Selektionsprinzip für T-Zellen im Thymus und für B-Zellen im Knochenmark. Um autoreaktive Zellen eliminieren zu können, lernen die B- und T-Zellen während ihrer Entwicklung, zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ zu unterscheiden. Weisen die T- Zellen im Thymus die Fähigkeit auf, präsentierte Autoantigene mit zu hoher Affinität zu binden, werden sie selektiert und gehen in Apoptose. Durch diese sogenannte negative Selektion wird sichergestellt, dass keine autoreaktiven Lymphozyten den Thymus verlassen (Goodnow *et al.*, 2005). Im Thymus können nur T-Zellen heranreifen, welche mit sehr geringer Affinität an präsentierte Autoantigene und hoher Affinität an MHC-Moleküle des eigenen Organismus binden (Klein *et al.*, 2009). Bei letzterem Prozess der positiven Selektion reifen die T-Zellen aus und gelangen in die Peripherie. Der Prozess der zentralen Toleranz ist aber nicht ausreichend, um Autoimmunität zu verhindern. T-Zellen mit einer Spezifität für körpereigene Antigene, welche nie im Thymus exprimiert bzw. präsentiert werden, oder für harmlose Antigene wie z.B. Nahrungsproteine, unterlaufen den Prozess der zentralen Toleranz (Steinman and Nussenzweig, 2002). Autoreaktive T-Zellen, die in der Peripherie vorkommen, unterliegen mehreren Mechanismen, die eine Autoimmunreaktion verhindern. Man spricht hier von der peripheren Toleranz (Steinman *et al.* 2003). Ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ist, dass autoreaktive T-Zellen in den Zustand der Anergie (Inaktivierung) gebracht werden, wenn das Antigen ohne kostimulatorisches Signal präsentiert wird (Schwartz, 2003). Wie in Kap. 1.3 beschrieben, werden zwei Signale für die Aktivierung naiver T-Zellen benötigt. Fehlt die Interaktion zwischen CD28 der naiven T-Zelle mit CD80/CD86 der DZ, so erhält die T-Zelle nur ein

## Einleitung

Aktivierungssignal über ihren TZR und wird anerg. Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz ist die klonale Deletion durch aktivierungsinduzierten Zelltod (activation induced cell death, AICD). Hierbei wird durch die Bindung zwischen dem auf aktivierten T-Zellen exprimierten Rezeptor Fas (CD95) und dem Liganden FasL (CD95L) die Apoptose der T-Zelle induziert (Tab. 1) (Lettau *et al.*, 2009; Van *et al.*, 1996). Eine weitere Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz haben sowohl die adaptiven als auch die natürlich vorkommenden Treg (s. Kap. 1.4).

### 1.6 Autoimmunität

Bei einer Autoimmunerkrankung werden durch autoreaktive Zellen körpereigene Antigene als „fremd“ erkannt und vom Immunsystem angegriffen. Wie es zu diesem Verlust der Toleranz gegen Selbstantigene kommt, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird diskutiert, dass eine genetische Prädisposition sowie diverse Umweltfaktoren wie Stress, Infektionen oder auch Schwangerschaft eine Rolle spielen könnten (Janeway, 2002).

### 1.7 *Diabetes mellitus*

Ein bedeutendes und klinisch hochrelevantes Beispiel für eine Autoimmunerkrankung ist der Typ 1 Diabetes, auf welchen im Nachfolgenden genauer eingegangen wird.

Beim *Diabetes mellitus* handelt es sich um ein Stoffwechselsyndrom, das sich vor allem durch den erhöhten Blut- und Harnglukosespiegel auszeichnet. Ursache ist eine unzureichende Insulinwirkung an den Leber-, Fett- und Muskelzellen und die daraus resultierende Entgleisung des Kohlenhydratstoffwechsels, sowie eine Störung im Fett- und Eiweißstoffwechsel (Renz-Polster, 2001). Unterschieden werden der Typ 1 *Diabetes* zum einen, bei dem aufgrund einer kompletten Zerstörung der Beta-Zellen ( $\beta$ -Zellen) in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas ein absoluter



## Einleitung

Insulinmangel resultiert (Groop *et al.*, 1986), sowie der Typ 2 *Diabetes* zum anderen, der durch eine Kombination aus Insulinresistenz und relativem Insulinmangel gekennzeichnet ist (Olefsky and Glass, 2010; Renz-Polster, 2001). Die Einteilung des *Diabetes mellitus* erfolgt in vier Gruppen: Typ 1 *Diabetes*, Typ 2 *Diabetes*, andere spezifische Diabetesformen und den Gestationsdiabetes (American *Diabetes* Association, 2012). Weltweit wurde bei etwa 366 Millionen Menschen *Diabetes* diagnostiziert. In Deutschland sind ca. 7 Millionen, europaweit ca. 50 Millionen Menschen an *Diabetes mellitus* erkrankt. Der Typ 2 Diabetes repräsentiert 90% aller Diabeteserkrankungen, während 5-10% der Betroffenen an Typ 1 *Diabetes* erkrankt sind (Deutscher Gesundheitsbericht *Diabetes*, 2012). Als Folge von Bevölkerungswachstum und zunehmender Urbanisierung, sowie Verbreitung ungesunder Ernährungs- und Lebensweisen schätzt die WHO, dass sich bis 2025 diese Zahlen verdoppeln werden.

### 1.8 *Diabetes* vom Typ 1

Aufgrund des Manifestationszeitpunktes im Kindes- und Jugendalter wird der *Diabetes mellitus* Typ 1 (T1D) auch als „juvener *Diabetes*“ bezeichnet und stellt eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung dar, durch die es zu einer selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas kommt (Babu and Eisenbarth, 2012). Dabei scheinen überwiegend T-Zell vermittelte Immunprozesse eine Rolle zu spielen, welche einen chronischen Inflamationsprozess induzieren, der zur Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch Lymphozyten führt (Tisch and McDevitt, 1996). Die Inselentzündung wird als *Insulitis* bezeichnet. Der Untergang der  $\beta$ -Zellen und die daraus resultierende verminderte Insulinsekretion führen zu einer massiven Störung des Glukosestoffwechsels mit pathologisch erhöhtem Serumglukosespiegel (Novak and Novakova, 2012). Zur klinischen Manifestation des T1D kommt es, wenn 80-90% der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen zerstört sind (Robles and Eisenbarth, 2001). Humorale Immunphänomene während der Zerstörungsphase und

## Einleitung

Diabetesmanifestation sind die T1D-spezifischen Autoantikörper (AAK) (Gillespie, 2006). Diese AAK werden lange bevor sich klinische Symptome des T1D bemerkbar machen gebildet und ermöglichen so eine frühe Diagnostik und Vorhersage des T1D bei Risikopersonen (Leslie *et al.*, 2001; Seissler *et al.*, 1998). Die für die Diagnostik wichtigen AAK sind Inselzellantikörper (ICA), Insulin-Autoantikörper (IAA) (Palmer, 1987), Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) (Baekkeskov *et al.*, 1990) und gegen Tyrosinphosphatase (IA2) (Lan *et al.*, 1996).

Bis heute ist die Ätiologie des T1D nicht eindeutig geklärt. Als Ursache wird ein Zusammenwirken von genetischer Prädisposition mit bestimmten Umweltfaktoren, wie Ernährungsfaktoren und Virusinfektionen angenommen (van Belle *et al.*, 2011). Gegenüber der Normalbevölkerung haben Verwandte ersten Grades ein 15-fach höheres Erkrankungsrisiko (Grant *et al.*, 2010). Bislang wurden 20 verschiedene Genloci identifiziert, die mit dem T1D assoziiert sind (Grant *et al.*, 2010). Dabei scheint insbesondere der HLA-Locus auf Chromosom 6p21 prädisponierend für T1D zu sein (Bertrams, 1984; Mehers and Gillespie, 2008). Mit der Entstehung von T1D sind mehrere human leucocyte antigen Moleküle (HLA) assoziiert. Bei 90-95% der an T1D erkrankten Patienten liegen die HLA Haplotypen DR4-DQ8 und DR3-DQ2 vor (Devendra and Eisenbarth, 2003).

Umweltfaktoren spielen zusätzlich eine Rolle in der Pathogenese des T1D. So werden eine frühe Kuhmilchexposition sowie Vitamin D-Mangel in den ersten Lebensjahren sowie Virusinfektionen durch Coxsackievirus B, Mumps, Epstein-Barr-Virus und Zytomegalievirus als mögliche Umweltrisikofaktoren diskutiert (Achenbach *et al.*, 2006; Gerstein, 1994; Honeyman *et al.*, 2000a; Honeyman *et al.*, 2000b; Honeyman *et al.*, 2000c; Hyoty and Taylor, 2002; Takiishi *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass es bei genetisch Prädisponierten zu einer Kreuzreaktion zwischen antigenen Strukturen der Umweltfaktoren (Virusepitope, bovines Albumin) und  $\beta$ -Zell-Antigenen (z.B. Glutamatdecarboxylase, GAD) kommt (Albert and Inman, 1999; Baum *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1994). Welche pathogenetischen Mechanismen Genetik und Umwelt verbinden, und warum es zu einer Autoimmunreaktion gegen die  $\beta$ -Zellen des Pankreas kommt, ist bis heute ungeklärt.

### 1.9 Die NOD-Maus: Modellsystem für humanen T1D

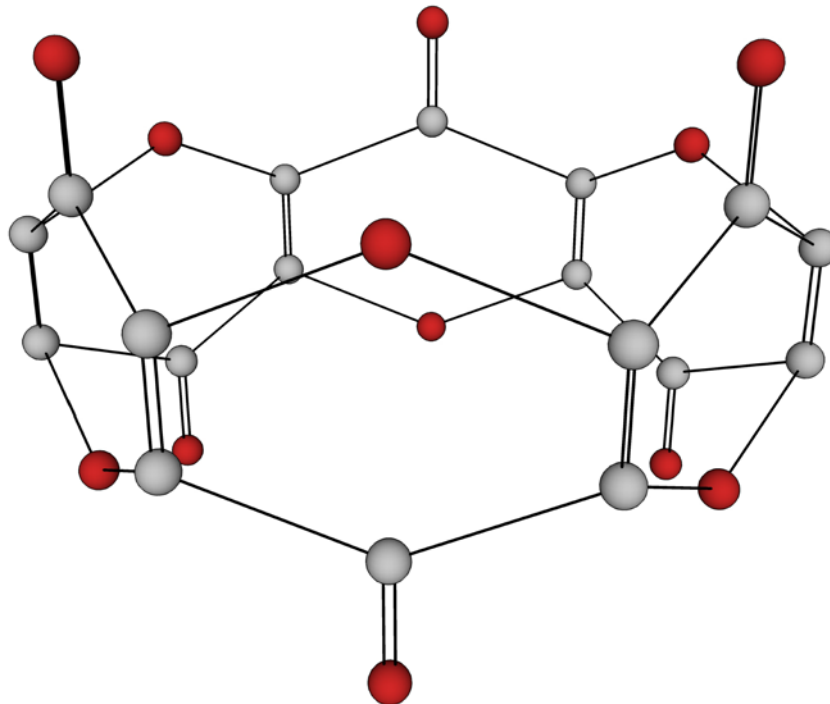
Das non-obese diabetic Mausmodell (NOD-Mausmodell) dient seit über 30 Jahren als Tiermodell für die experimentelle Erforschung genetischer und pathogenetischer Grundlagen des humanen T1D (Thayer *et al.*, 2010).

Der Stamm der NOD-Maus hat seinen Ursprung in Japan (Makino *et al.*, 1980). Bei der NOD-Maus gibt es ähnlich wie beim humanen *Diabetes* mehrere genetisch prädisponierende Faktoren, welche bei der Entwicklung des *Diabetes* eine entscheidende Rolle spielen. Dreißig Genloci auf 15 Chromosomen sind derzeit identifiziert, welche in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung des *Diabetes* in der NOD-Maus stehen (Driver *et al.*, 2011). Der insulin dependent diabetes 1 (Idd1) Locus, der für die MHCII-Moleküle der Maus kodiert, ist essentiell für die Entwicklung einer invasiven *Insulitis* und so der wichtigste beitragende Faktor zur Entwicklung des T1D (Prochazka *et al.*, 1989; Wicker *et al.*, 1995). In diesem Tiermodell entwickeln ca. 80% der weiblichen und 20% der männlichen Tiere spätestens nach der 20. Woche spontan einen insulinabhängigen *Diabetes* (Leiter *et al.*, 1987). Die Tiere zeigen die für den T1D typischen Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust und Hyperglykämie. Neben der Entwicklung des T1D ist die NOD-Maus auch anfällig für andere autoimmune Erkrankungen, wie z.B. *Sialitis* (Hu *et al.*, 1992) und *Thyreoiditis* (Many *et al.*, 1996).

Histologisch betrachtet weisen die Tiere im Alter von 3-5 Wochen zelluläre Infiltrate in den Periinselregionen (*Periinsulitis*) des Pankreas auf, die sich während des fortschreitenden Alters zu massiv progressiven Infiltrationen (*Intrainsulitis*) entwickeln. Bei den einwandernden Zellen handelt es sich um CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK- Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen (Kikutani and Makino, 1992). In erster Linie ist die Erkrankung aber abhängig von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Bach, 1994; Wicker *et al.*, 1986).

### 1.10 MCS-18

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von MCS-18 im NOD-Mausmodell und an murinen DZ sowie B-Zellen untersucht. Bei MCS-18 handelt es sich um eine natürliche Substanz, welche aus dem Purpur-Nieswurz (*Helleborus purpurascens*) aus der Gattung der Christrosen isoliert wird. Die komplette chemische Strukturformel für MCS-18 ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Durch Zyklooligomerisierung des anorganischen Gases Kohlenstoffsuboxid ( $C_3O_2$ ) bekommt die als „macrocyclic carbon suboxide“ (MCS) bezeichnete Substanz ihren strukturellen Rahmen. Es wird angenommen, dass Hexamere und Oktamere der Kohlenstoffsuboxide makrozyklische Ringe bilden, die das makrozyklische Kohlenstoffsuboxid-Derivat (MCS) bilden. In Abb. 5 ist eine hypothetische Strukturformel der makrozyklischen Komponente dargestellt. In der Balkanregion wird die Christrose als traditionelles Heilmittel z.B. als Therapeutikum bei entzündungsbedingten Schmerzen eingesetzt. Das auf Christrosenextrakt basierende Produkt Boicil<sup>®</sup> wird in Rumänien erfolgreich als antirheumatisches Medikament in Form von Salben oder Injektionslösung angewandt. In den letzten 10 Jahren wurden, um die Wirkung der Christrose besser verstehen zu können, zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. So wurde 1999 beschrieben, dass eine Fraktion (HP12) von mehreren hoch aufgereinigten *Helleborus* Extrakten sowohl die Mitogen-, als auch die Alloantigen-induzierte Proliferation von T-Zellen vollständig supprimiert. Ebenso wurde gezeigt, dass durch diese *Helleborus*fraktion der immunsuppressive Effekt von Ciclosporin A um den Faktor 200 potenziert wird (Terness *et al.*, 1999). Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass MCS-Substanzen als starke Inhibitoren sowohl der Kaninchen-spezifischen Na-K-ATPase als auch der Rattennieren-spezifischen Na-K-ATPase eingesetzt werden können (Kerek *et al.*, 2002; Stimac *et al.*, 2003).



**Abb. 5: Chemische Strukturformel eines MCS-Hexamers.** Sechs Kohlenstoffsuboxide sind durch die Anordnung zu makrozyklischen Ringen an der kronenähnlichen Struktur des makrozyklischen Kohlenstoffsuboxid-Derivats (MCS) beteiligt. (Abb. modifiziert nach Kerek et al. 2002). rote Kugel: Sauerstoff, graue Kugel: Kohlenstoff

Des Weiteren hat MCS-18 eine antagonistische Wirkung auf den nicht-selektiven Kationenkanal (TRPV1) (Neacsu *et al.*, 2010). In einer ersten klinischen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die aus der Christrose isolierte makrozyklische Substanz in der Lage ist, eine pathologisch aktivierte Immunreaktion, wie sie bei der rheumatoiden Arthritis vorliegt, zu unterdrücken (Nica *et al.*, 2005). In einer Arbeit von Horstmann *et al.* (2007) wurde die Wirkung von MCS-18 erstmals *in vitro* an humanen dendritischen Zellen und *in vivo* im EAE-Mausmodell getestet. Die Expression der typischen DZ-Reifungsmarker, wie CD80, CD86 und vor allem CD83, konnte durch MCS-18 unterdrückt werden. Die bei den Mäusen im EAE-Modell hervorgerufenen Paralysesymptome konnten sowohl durch eine prophylaktische als auch durch eine therapeutische Gabe von MCS-18 stark reduziert werden (Horstmann *et al.*, 2007).

## Einleitung

### 1.11 Ziele der wissenschaftlichen Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluß von MCS-18 sowohl *in vitro* an murinen DZ als auch an B-Zellen zu untersuchen. Des Weiteren wird die immunsuppressive Kapazität von MCS-18 an Hand des NOD-Mausmodells *in vivo* analysiert.

Die immunmodulatorische Wirkung von MCS-18 soll zum einen an murinen DZ als auch an B-Zellen *in vitro* Untersuchungen untersucht werden. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Inhibiert MCS-18 die Expression DZ-spezifischer Oberflächenmoleküle muriner DZ, welche aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen bzw. NOD-Mäusen kultiviert werden?
2. Besitzen die mit MCS-18 behandelten C57BL/6-DZ bzw. NOD-DZ eine verminderte Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren? Ist die Zytokinsekretion der DZ durch die Applikation von MCS-18 beeinträchtigt?
3. Hat MCS-18 einen Einfluss auf die Proliferation und auf die Immunglobulinsekretion muriner B-Zellen?

Zum anderen sollen im *in vivo* Modell die Auswirkungen der prophylaktischen Gabe von MCS-18 bei NOD-Mäusen untersucht werden. Hierzu soll auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

4. Unterscheidet sich die Diabetesinzidenz der mit MCS-18 behandelten Mäuse gegenüber den der unbehandelten Kontrolltiere?
5. Inwieweit nimmt die Applikation von MCS-18 Einfluss auf die Expression von IFN- $\gamma$ , Foxp3, Insulin 1 und Insulin 2 spezifische mRNA im Pankreasgewebe bei MCS-18 behandelten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren?

## Einleitung

6. Wird die zelluläre Expression von Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, pankreatischen Lymphknoten (PLN) und Pankreas durch die Verabreichung von MCS-18 beeinträchtigt?
7. Welchen morphologischen Zustand weisen die insuliproduzierenden Langerhans'schen Inseln nach Behandlung mit MCS-18 auf?
8. Welche Auswirkung hat die Behandlung mit MCS-18 auf die Anzahl der peptidspezifischen, IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen in der Milz?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

#### **2.1.1 Verwendete Mausstämme**

Die für die Experimente herangezogenen NOD-Mäuse standen aus eigener Zucht zur Verfügung. Die C57BL/6- und BALB/C-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Vorwiegend wurden weibliche Tiere im Alter von 6-12 Wochen für die Versuche verwendet.

#### **2.1.2 Genehmigung der Tierversuche**

Die zum Zwecke immunologischer Untersuchungen am Tier vorgenommenen Immunisierungen und Organentnahmen wurden bei der Gesundheitsbehörde der Stadt Erlangen entsprechend dem Tierschutzgesetz angezeigt. Die Durchführung der genehmigungspflichtigen Versuche wurde vom Regierungspräsidium Mittelfranken bewilligt (Akz.-Z. 54-2531.31-18/07).

#### **2.1.3 Zucht und Haltung der NOD-Mäuse**

Die Zucht sowie die Haltung der NOD-Mäuse erfolgten im Franz-Penzolt-Zentrum (FPZ) des Universitätsklinikums Erlangen. Die Tiere wurden dort im IVC-System Blueline von der Firma Tecniplast innerhalb eines barrieregeschützten Raums (Trockenbarriere) unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Gruppengröße betrug 2-5 Tiere pro Käfig. Das Lichtprogramm gab einen 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus vor. Die Raumtemperatur betrug 20°C +/- 2°C. Die absolute Luftfeuchtigkeit war auf 9 g/kg Luft eingestellt. So ergab sich in der Abluft eine



## Material und Methoden

relative Luftfeuchtigkeit von 60% +/- 5% und in der Zuluft eine relative Luftfeuchtigkeit von 50% +/- 5%. Im Tierraum erfolgte ein 15-facher Luftwechsel pro Stunde. Die Käfige sowie die Einstreu und die Flaschen mit Wasser wurden vor Gebrauch komplett autoklaviert. Futter (Alleinfutter Typ M-Z, Sniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Ein Betreten des Tierraums erfolgte nur in kompletter chirurgischer Schutzkleidung, bestehend aus grüner Op-Hose und grünem Op-Hemd, Überschuhen, OP-Haube, OP-Mundschutz und Handschuhen.

### 2.1.4 Haltung der C57BL/6- und BALB/C-Mäuse

Die C57BL/6- und BALB/C-Mäuse wurden in einer Gruppengröße von 2-5 Tieren pro Käfig in dem zur Hautklinik gehörenden Maushaus gehalten. Die Raumtemperatur betrug 20°C +/- 2°C. Im Tierraum betrug die relative Luftfeuchtigkeit 50% +/- 5% und es erfolgte ein 15-facher Luftwechsel pro Stunde. Auch hier wurden die Käfige (Eurostandard, Type II L 365x207x140 mm, Tecniplast®, Buguggiate, Italien) mit Einstreu sowie die Flaschen mit Wasser vor Gebrauch komplett autoklaviert. Zudem wurden auch die Gitterdeckel und Filterhauben vor Gebrauch autoklaviert. Futter (Typ Standarddiät Maus, Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Ein Betreten des Tierraums erfolgte nur in kompletter chirurgischer Schutzkleidung, bestehend aus Labormantel, Überschuhen, OP-Haube, OP-Mundschutz und Handschuhen. Das Licht war ebenfalls auf einen 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus eingestellt.

## 2.2 Material

## 2.2.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller, Stadt, Land
Autoklav	Systec 3150 EL	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
AxionCam	MRc	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	B6060	Haereus, Hanau, Deutschland
Casy <sup>®</sup> -Zellzählgerät	Modell TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Durchflusszytometer	FACScan <sup>™</sup>	BD, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Mailand, Italien
ELISA-Reader	Multiskan <sup>®</sup> Plus	Labsystems, Frankfurt a. Main, Deutschland
ELISA-Washer	Columbus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Elispot-Reader	Axioplan 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Eppifuge	Biofugepico	Haereus, Hanau, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 220M	Zeiss, Jena, Deutschland
Fotokamera	Coolpix 4500	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Ökosuper	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Herafreeze	Haereus, Hanau, Deutschland
Harvester	ICH-110	Inotech, Dottikon, Schweiz
Kryotom	Kryocut CM 2000	Leica, Bensheim, Deutschland
Kühlschränke (4°C)	Comfort	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
LC Carousel Centrifuge	2.0	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
LightCycler <sup>™</sup>	2.0	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
MACS <sup>®</sup> Magnetplatte	Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Megafuge	2.0RS	Haereus, Hanau, Deutschland
Mikrotom		Vogel GmbH & Co.KG, Gießen, Deutschland
Mikroskop	Optiphot	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Minishaker	Vortex MS1	IKA Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Peltier Thermal Cycler	Model PTC-200	MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
Reinstwasseranlage	Easypure II	Pure Aqua <sup>®</sup> , Schnaitsee, Deutschland
Spektrophotometer	Nanodrop 2000c	PeQlab, Erlangen, Deutschland

## Material und Methoden

Spektrophotometer	Multiskan <sup>®</sup> Plus	Labsystems, Frankfurt, Deutschland
Sterilbank	Laminar-Flow-Box Herasafe	Haereus, Hanau, Deutschland
Szintillationszähler	1450 Microbeta <sup>TM</sup> Plus	WallacOy ,Turku, Finland
Wasserbad	SW20	Julabo , Seelbach, Deutschland
Werkbank	TL 243	Haereus, Hanau, Deutschland

### 2.2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Typ	Hersteller, Stadt, Land
Alleinfutter für Mäusezucht	M-Z	Sniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Combitips plus	0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Casy <sup>®</sup> -Cups Messgefäße	10 ml	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Deckgläser	24x50 mm	VWR-International, Darmstadt, Deutschland
Einmal-Feindosierungsspritzen	Omnifix <sup>®</sup> -F1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritzen	BD, Plastikpak 10 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Einmal-Handschuhe	Nitrile	Sempercure <sup>®</sup> , Wien, Österreich
Einmal-Injektionskanülen	Nr.20 0,4x19 mm	BD, Heidelberg, Deutschland
Facs-Röhrchen	600 µl	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Filterspitzen	Safe Guard <sup>TM</sup> 10, 20 µl	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Glasfaserfilter	PrintedFiltermat A, 90x120 mm	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Glukose-Teststreife	Diabur 5000	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Gummiband-Gesichtsmaske	3M <sup>TM</sup> OP-Maske	3M Health Care, Neuss, Deutschland
Labortiereinstreu	LTE E-001	Abedd <sup>®</sup> , Wien, Österreich
LightCycler <sup>TM</sup> - Kapillaren	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
MACS <sup>®</sup> Trennsäule	LS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multiwell-Platten	6, 12, 24, 96 Well	BD, Heidelberg, Deutschland
Objektträger	Super Frostultra plus <sup>®</sup> 75x25 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

## Material und Methoden

Objektträger	76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
OP-Hauben	Bouffantflex	Dahlhausen & Co.GmbH, Köln, Deutschland
OP-Mundschutz	MaiMed <sup>®</sup> - FM Comfort	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen steril	15, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Serologische sterile Pipetten	5, 10, 25 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Szintillationswachs	MeltiLex <sup>TM</sup> A	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Sterilfilter	Millex <sup>®</sup> -GP 0,22 µm	Millipore, Corrigtwhill, Irland
Tierhaltungsfutter	Standarddiät Maus	Altromin, Lage, Deutschland
Überschuhe	CPE, blau	Dahlhausen & Co.GmbH, Köln, Deutschland
Petrischalen	BD Falcon <sup>TM</sup> 100x15 mm	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflasche	Nunc EasYFlasks <sup>TM</sup> 175 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zellsieb CellStrainer	70 µm	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.3 Gebrauchsmaterial

Material	Typ	Hersteller, Stadt, Land
Filterhauben	Mini-Isolator <sup>TM</sup>	Tecniplast <sup>®</sup> , Buguggiate, Italien
Gitterdeckel	Serie 116	Tecniplast <sup>®</sup> , Buguggiate, Italien
IVC-System	Blueline	Tecniplast <sup>®</sup> , Buguggiate, Italien
Mehrkanalpipette	Research <sup>®</sup> 8-Kanal 0- 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper	Multipette <sup>®</sup> plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tierkäfige	Eurostandard Type II L 365x207x140 mm	Tecniplast <sup>®</sup> , Buguggiate, Italien
Tränkeflaschen	250 ml	Tecniplast <sup>®</sup> , Buguggiate, Italien

## 2.2.4 Medien und Puffer

Medien/Puffer		Zusammensetzung	Hersteller, Stadt, Land
ELISA-Waschpuffer	500 ml	PBS (phosphate buffered saline)	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	0,1%	Tween-20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FACS-Puffer	500 ml	PBS	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	5%	sterilisiertes, hitzeinaktiviertes FKS (fetales Kälberserum)	PAA, Cölbe, Deutschland
	1%	10% Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,6% Ammoniumchlorid-Puffer	1,6 g 1 l	Ammoniumchlorid ddH <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2% Formaldehydlösung	500 ml	PBS	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	2%	Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
HL-1-Medium (komplett)	500 ml	HL-1-Medium	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	100 U/ml	Penicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	100 µg/ml	Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	2 mM	L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	50 µM	2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MACS-Puffer	500 ml	PBS	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	0,5%	sterilisiertes, hitzeinaktiviertes FKS	PAA, Cölbe, Deutschland
	2 mM	EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Zellkulturmedium (R10-Medium)	500 ml	RPMI 1640	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	50 ml	sterilisiertes, hitzeinaktiviertes FKS	PAA, Cölbe, Deutschland
	100 U/ml	Penicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

## Material und Methoden

	100 µg/ml	Streptomycin	Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	2 mM	L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	50 µM	2- Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Elispot-Medium	500 ml	RPMI 1640	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
	5 ml	Hepes	Lonza, Verviers, Belgien
	5 ml	L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	500 µl 25 ml	Gentamycin sterilisiertes, hitzeinaktiviertes FKS	Lonza, Verviers, Belgien PAA, Cölbe, Deutschland

### 2.2.5 Verwendete Computerprogramme

- Flowjo Version 7.6.4, Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
- Microsoft Word, Version Office 2010, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
- Microsoft Power Point, Version Office 2010, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
- Microsoft Excel, Version Office 2010, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
- Microsoft DOS, Flow2, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
- Casy<sup>®</sup> stat Analyse System, Version 4.0, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- KS ELISPOT System, Version 4.1.3, Zeiss, Jena, Deutschland
- LightCycler<sup>™</sup>-Software, Version 4.2.0, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Reference Manager, Version 12, Thomson Corporation, San Francisco, CA, USA
- GraphpadPrism, Version 5.2, Kalifornien, San Diego, CA, USA

## Material und Methoden

- CorelDRAW, Version X6, Corel, Unterschleißheim, Deutschland

### 2.2.6 Chemikalien und Reagenzien

- Aceton, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ammoniumchlorid, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Annexin binding buffer, BD, Heidelberg, Deutschland
- Aqua dest., Braun, Melsungen, Deutschland
- BSA (bovine serum albumin), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Casyton® Isotone Kochsalzlösung, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Complete mini protease inhibitor, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Dako mounting medium, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
- Dakopen, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
- DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), eingesetzte Konzentration 1:1000, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Einbettmedium Tissue-Tek® Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
- Liberase CL, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- PJ (Propidiumiodid), eingesetzte Konzentration 1:1000, BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.7 Spezielle Reagenzien

#### 2.2.7.1 DZ-Reifungsstimuli und Zytokine

Stimuli	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
TNF- $\alpha$	500 U/ml	PeproTech, Cölbe, Deutschland
IL-4	800 U/ml	PeproTech, Cölbe, Deutschland

## Material und Methoden

IL-5	150 U/ml	PeproTech, Cölbe, Deutschland
INF- $\gamma$	1000 U/ml	PeproTech, Cölbe, Deutschland
LPS (E.coli Serotyp O127:B8)	1 $\mu$ g/ml	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
anti-CD40 ( FGK45)	1:100	Laboreigener, aufgereinigter Hybridomüberstand

### 2.2.7.2 Gebrauchsfertige Kits

- Anti-Maus Foxp3-PE- Kit, eBioscience, San Diego, CA, USA
- Avidin-Biotin-Blocking-Kit, Vector, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD, Heidelberg, Deutschland
- RNeasy mini-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- QIA shredder-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- RNase-Free DNase-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- First Strand cDNA Synthese-Kit, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- DyNAmo™ Capillary SYBR® Green qPCR-Kit, Finnzymes, Espoo, Finnland
- Annexin V/ FITC-Kit, Bender MedSystems, Wien, Österreich
- MACS CD19 Microbeads-Kit, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
- CBA Maus-Inflammation-Kit: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12p70, BD, Heidelberg, Deutschland
- Elisa Maus-Kit: IgM, IgG2b, BD, Heidelberg, Deutschland
- Elisa Maus-Kit: IL-1 $\beta$  Duo Set, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
- Elispot Maus-Kit: IFN- $\gamma$  mit pre-coated Platten, Mabtech, Nacka Strand, Schweden



### 2.2.7.3 Antikörper für den Elispot-Assay

- Biotinylierter anti-Maus-IFN- $\gamma$  (Klon R4-6A2), eingesetzte Konzentration 1:1000, Mabtech, Nacka Strand, Schweden

### 2.2.7.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konzentration	Bezugsquelle
B220	RA3-6B2	PerCP	rat IgG2a	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4	RM 4-5	FITC	rat IgG2a	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD8	53-6.7	FITC	rat IgG2a	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD11c	N418	FITC	ham IgG	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD19	6D5	FITC	rat IgG2a	1:100	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD25	PC61	PerCp-Cy5.5	rat IgM	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD40	3-23	FITC	rat IgG2a	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD80 (B7-1)	16-10A1	FITC	ham IgG	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD83	Michel-19	PE	rat IgG1	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD86 (B7-2)	GL-1	FITC	rat IgG2b	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland

## Material und Methoden

Foxp3	FJK-16s	PE	rat IgG2a	1:100	eBioscience, San Diego, CA, USA
IgM		FITC		1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IgG1		PE		1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IgG2a		PE		1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IgG2b		PE		1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MHCII	M5-114	PE	rat IgG2b	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
RT1B	Ox-6	PE	rat IgG1	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.7.5 Antikörper für die Isotypkontrollen

Isotyp	Klon	Konjugat	Konzentration	Bezugsquelle
rat IgG1	R3-34	PE	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
rat IgG2a	A35-95	FITC	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
rat IgG2b	A95-1	PE	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
ham IgG2	C235-2356	FITC	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
rat IgM		FITC	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.7.6 Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antigen	Klon	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
porcines Insulin	polyklonal	Meerschweinchen	1:50	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
CD4	GK 1.5	rat IgG2b	1:100	BD, Heidelberg, Deutschland
CD8	Ly-2	rat IgG2a	1:100	eBioscience, San Diego, CA, USA
Foxp3	FJK-16s	rat IgG2a	1:100	eBioscience, San Diego, CA, USA

### 2.2.7.7 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antigen	Spezies	Konjugat	Konzentration	Bezugsquelle
Ratte IgG	Ziege	biotinyliert	1:1000	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
Meerschweinchen IgG	Ratte	TRITC	1:50	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### 2.2.7.8 Fluorophore für die Immunfluoreszenzfärbung

- Streptavidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, eingesetzte Konzentration 1:1000, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- FITC-Annexin V, eingesetzte Konzentration 1:40, BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.2.7.9 Primer

Gen	Sense	Antisense	Anneling-Temperatur
HPRT	5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTTG-3'	5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGGC-3'	58°C
Foxp3	5'-CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT-3'	5'-CCT TGC CTT TCT CAT CCA GGA-3'	58°C
Insulin 1	5'-ACA ACT GGA GCT GGG AGG AA-3'	5'-AAA TGC TGG TGC AGC ACT GA-3'	58°C
Insulin 2	5'-ACC CAG GCT TTT GTC AAG CA-3'	5'-CGG GAC ATG GGT GTG TAG AAG-3'	58°C
IFN-γ	5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG -3'	5'-GTC ACA GTG TTC AGC TGT ATA GGG -3'	58°C

### 2.2.7.10 Autoantigene

Für die Stimulation der im Elispot eingesetzten Milzzellen wurden folgende Peptide verwendet: aus der B-Kette des murinen Insulins <sup>9</sup>SHLVEALYLVCGERG<sup>23</sup> und <sup>15</sup>LYLVCGERG<sup>23</sup>, sowie KYNKANAF, welches das mimotope Peptid NRP-A7 repräsentiert, das durch T-Zell-Rezeptoren CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird. Die Peptide wurden alle von der Firma MultiSynTech (Bochum, Deutschland) hergestellt und wiesen eine Reinheit von >95% auf.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Zellkulturmethoden

#### 2.3.1.1 Kultivierung der Zellen

Zellkulturarbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub>, feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und

37°C kultiviert. Die Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C für 5 Min bei 1200 rpm durchgeführt.

### **2.3.1.2 Zellzählung**

Um eine definierte Zellzahl in den jeweiligen Versuchen einzusetzen, wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät CASY<sup>®</sup> 1 bestimmt. Die Zellzahl wurde jeweils aus den wie in Kap. 2.3.1.4, Kap. 2.3.1.5, Kap. 2.3.5.1 und Kap. 2.3.5.2 hergestellten Zellsuspensionen bestimmt. Das Messprinzip beruht auf einer Widerstandsmessung in Verbindung mit einer Signalauswertung. Die Zellsuspension wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Meßkapillare mit einem Innendurchmesser von 150 µm gesaugt. Über zwei Platinelektroden ist eine elektrische Spannung angelegt. Beim Durchtritt verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Dadurch kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Das Volumen der Zellen kann somit über den Zellzähler ermittelt und die Zellzahl bestimmt werden. Für die Messung wurden 10 µl Zellsuspension in 10 ml Casyton<sup>®</sup> (isotoner Puffer) pipettiert.

### **2.3.1.3 Gewinnung von murinem GM-CSF Zellkulturüberstand**

Dendritische Zellen können durch eine *in vitro* Kultur von Knochenmarkszellen in Anwesenheit von GM-CSF gewonnen werden (Inaba *et al.*, 1992). Das in dieser Arbeit verwendete murine GM-CSF wurde aus dem Kulturüberstand einer mit murinem GM-CSF stabiltransfizierten produzierenden Plasmazytom-X63-Ag8-Zelllinie gewonnen. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Myelomazelllinie, welche mit GM-CSF cDNA transfiziert wurde, welche mittels PCR aus einem T-Zellklon isoliert wurde (Zal *et al.*, 1994). Die Zellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium (R10-Medium) für 2-4 Tage in Petrischalen kultiviert. Danach wurden sie in 50 ml Falcon überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml frischem R10-Medium

aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilt. Nach 3-4 Tagen wurden 80 ml der Zellsuspension bei 3000 rpm und 4°C für 15 Min zentrifugiert und der Überstand in sterile Gefäße überführt. Die restlichen 20 ml der Zellsuspension wurden wieder auf 100 ml mit frischem R10-Medium aufgefüllt und für weitere 3-4 Tage kultiviert. Vor Verwendung wurde der GM-CSF Kulturüberstand sterilfiltriert.

### **2.3.1.4 Knochenmarkspräparation für DZ-Gewinnung**

Für die Gewinnung von DZ aus dem Knochenmark von C57BL/6- und NOD-Mäusen wurde den durch CO<sub>2</sub> Begasung getöteten Mäusen der linke und rechte *Femur* (Oberschenkel) sowie die linke und rechte *Tibia* (Unterschenkel) unter sterilen Bedingungen freipräpariert und entnommen. Das Sehnen -und Muskelgewebe wurde entfernt. Zur Desinfektion wurden die Knochen in 70% Ethanol gelegt und nach einer Einwirkzeit von 2 Min an beiden Enden mit einer sterilen Schere geöffnet. Das Knochenmark wurde mittels einer mit PBS gefüllten Spritze aus dem Knochen gespült. Im Anschluss wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, nach der Zentrifugation in R10-Medium aufgenommen und gezählt (s. Kap. 2.3.1.2). Die Zellausbeute lag bei  $4\text{-}6 \times 10^7$  Knochenmarkszellen pro Maus.

### **2.3.1.5 Gewinnung muriner DZ aus dem Knochenmark**

Die Gewinnung von DZ aus murinem Knochenmark wurde erstmals von Inaba und Mitarbeitern beschrieben (Inaba *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die nach Lutz und Mitarbeitern (1999) modifizierte Methode verwendet. Pro Petrischale wurden  $2 \times 10^6$  Zellen ausgesät und in 10 ml R10-Medium, das mit 10% GM-CSF Kulturüberstand versetzt war, aufgenommen. Nach drei Tagen wurden weitere 10 ml R10-Medium mit 10% GM-CSF Kulturüberstand zugegeben. An den Tagen 6 und 8 wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension abgenommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml frischem 10% GM-CSF haltigem

## Material und Methoden

R10-Medium aufgenommen und zurück in die Petrischale gegeben. Die DZ wurden am Tag 8 für die jeweiligen Experimente aus der Petrischale entnommen und gezählt (s. Kap. 2.3.1.2). Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml R10-Medium aufgenommen und pro Well ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in eine 24-Wellplatte ausgesät. Für die jeweiligen Experimente wurden die Zellen mit MCS-18 inkubiert und mit den unter Kap. 2.2.7.1 aufgeführten Stimuli gereift. Um die Wirkung von MCS-18 auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von DZ zu untersuchen, wurden die aus C57BL/6-Mäusen gewonnenen DZ mit einer Konzentration von 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml MCS-18 für 24 Std in einer 24-Wellplatte inkubiert. Die Inkubation der DZ aus NOD-Mäusen betrug 36 Std. Die mit MCS-18 behandelten DZ wurden auch in der gemischten Leukozyten-Reaktion (mixed leucocyte reaction, MLR) eingesetzt. Als Kontrolle (*mock*) dienten Zellen, welche nur gereift und nicht mit MCS-18 inkubiert wurden.

### 2.3.2 MCS-18 Behandlung *in vivo* im NOD-Mausmodell

#### 2.3.2.1 Beschreibung des Versuchsablaufs

Um die Wirkung von MCS-18 im NOD-Mausmodell zu untersuchen, wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (n=41), Gruppe 2 (n=8), Gruppe 3 (n=10), Gruppe 4 (n=9). Vor Versuchsbeginn wurde bei allen Tieren die Glukosekonzentration im Harn bestimmt (s. Kap. 2.3.4). Ab der 10. Lebenswoche wurde jeweils nach sieben Tagen, die Glukosekonzentration im Harn der Mäuse bestimmt (s. Kap. 2.3.4). Bei einem positiven Befund wurden die Mäuse als diabetisch gewertet und durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet. Ende des gesamten Versuchs war die 30. Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle noch lebenden Tiere durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet. Die weitere Aufarbeitung und Analyse der Organe erfolgte wie in Kap. 2.3.5 beschrieben. Ein Teil der aus der Milz gewonnenen Zellen wurden auf Expression bestimmter extrazellulärer Oberflächenmoleküle (s. Kap. 2.3.6.2) sowie des intrazellulären Foxp3 (s. Kap. 2.3.6.3) mittels FACS-Analyse (s.

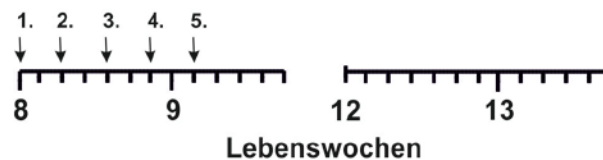
## Material und Methoden

Kap. 2.3.6.1) untersucht. Der andere Teil wurde mittels Elispot-Analyse untersucht (s. Kap. 2.3.6.7). Das Pankreasgewebe wurde, wie in Kap. 2.3.5 beschrieben, aufgeteilt und analysiert.

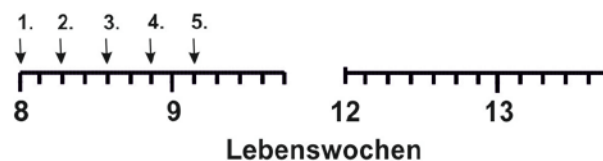
### 2.3.3 Injektionsmethode zur Applikation von MCS-18

MCS-18 wurde den Mäusen durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen im kaudalen Drittel des Bauches verabreicht. Die Injektionen wurden wechselseitig (linke oder rechte Seite) durchgeführt. Die Mäuse waren nicht narkotisiert. Die Kontrolltiere aus Gruppe 1 (n=41) blieben unbehandelt. MCS-18 (1 mg bzw. 2 mg) wurde in einem Volumen von 100 µl bzw. 200 µl mittels einer Einmal-Feindosierungsspritze injiziert. Den Tieren aus Gruppe 2 (n=8) wurde ab der 8. Lebenswoche 1 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus verabreicht (Abb. 6a).

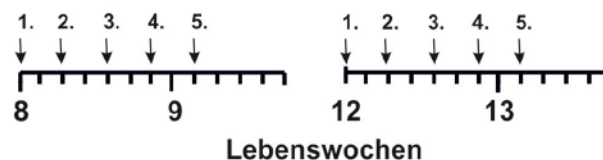
a) 8. Lebenswoche 5 mal 1 mg MCS-18



b) 8. Lebenswoche 5 mal 2 mg MCS-18



c) 8. und 12. Lebenswoche 5 mal 2 mg MCS-18





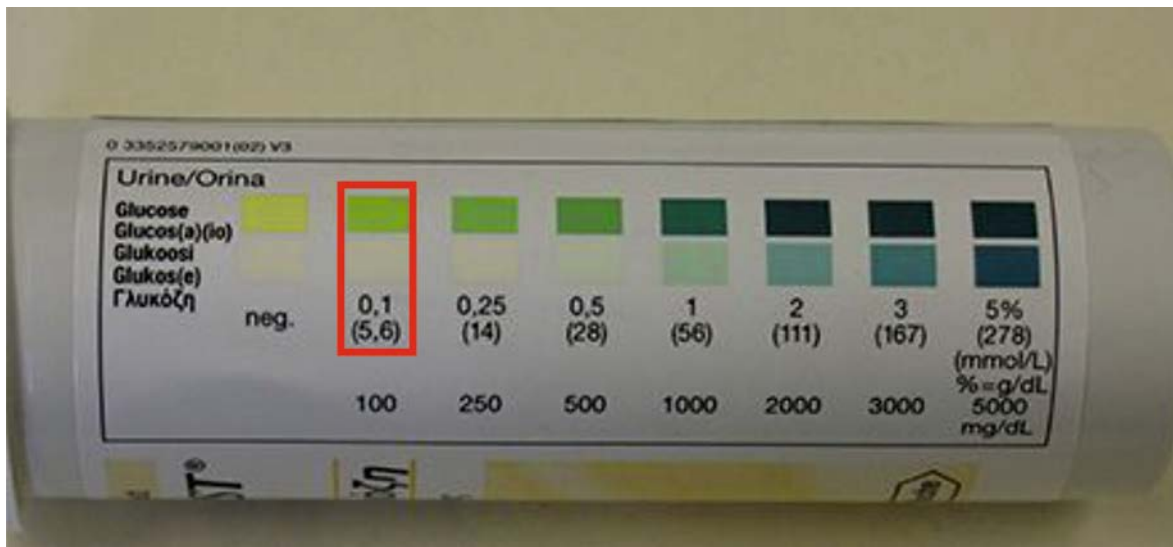
## Material und Methoden

**Abb. 6: Zeitschema der Versuchsdurchführung.** Die Applikationszeitpunkte von MCS-18 sind durch Pfeile dargestellt. **a)** zeigt das Zeitschema für die Mäuse aus Gruppe 2. Ab der 8. Lebenswoche erhielten die Tiere (n=8) jeden zweiten Tag 1 mg MCS-18 i.p.. Insgesamt erhielten die Tiere 5 Injektionen mit 1 mg MCS-18. **b)** zeigt das Zeitschema für die Mäuse aus Gruppe 3 (n=10). Ab der 8. Lebenswoche erhielten die Tiere jeden zweiten Tag 2 mg MCS-18 i.p.. Insgesamt erhielten die Tiere 5 Injektionen mit 2mg MCS-18. **c)** zeigt das Zeitschema für die Mäuse aus Gruppe 4 (n=9). Ab der 8. sowie 12. Lebenswoche erhielten die Tiere jeden zweiten Tag 2 mg MCS-18. Insgesamt erhielten die Tiere 2 mal 5 Injektionen mit 2 mg MCS-18 i.p..

Die Tiere aus Gruppe 3 (n=10) erhielten ab der 8. Lebenswoche 2 mg MCS-18 (Abb. 6b) fünfmal im 2-Tages-Rhythmus. Den Tieren aus der Gruppe 4 (n=9) wurde 2 mg MCS-18 in der 8. Lebenswoche sowie in der 12. Lebenswoche fünfmal im 2-Tages-Rhythmus appliziert (Abb. 6c).

### 2.3.4 Bestimmung der Diabetesinzidenz durch Nachweis der Harnglukose

Der Nachweis der Harnglukose erfolgte mit Hilfe von Teststäbchen (Diabur Test 5000, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Der Harnabsatz erfolgte entweder spontan oder konnte durch Massage der Urogenitalregion ausgelöst werden. Das Prinzip dieser Teststäbchen wird im Folgenden erklärt: Durch das Aufbringen von Harn auf das Teststäbchen wird eine chemische Reaktion ausgelöst. D-Glukose aus dem Harn wird durch die spezifische Glukose-Oxidase-Peroxidase Reaktion enzymatisch mit Luftsauerstoff zu  $\delta$ -D-Gluconolacton oxidiert und das Oxidationsprodukt Wasserstoffperoxyd wird freigesetzt. Durch den Indikator TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) wird die Menge an entstandenem Reaktionsprodukt mittels Farbumschlag sichtbar gemacht. Anschließend vergleicht man den Farbumschlag des Teststäbchens mit der vom Hersteller mitgelieferten Farbskala (Abb. 7). Bei Erreichen eines Harnglukosegehalts von  $> 5,5$  mmol/l galten die Tiere als diabetisch und wurden durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet (s. Kap. 2.3.2).



**Abb. 7: Farbskala zur Bestimmung der Harnglukose.** Die grün-blauen Felder der Farbskala werden mit dem Teststäbchen verglichen. Die Farbskala erstreckt sich von gelb = negativ bis dunkelblau = 278 mmol/l. Ergab sich eine Grünverfärbung des Teststäbchens, wie im rot markierten Bereich abgebildet, entsprach dies einer Glukosekonzentration > 5,5mmol/l.

### 2.3.5 Organentnahme der euthanasierten Tiere am Versuchsende

Aus jeder der durch CO<sub>2</sub> Begasung getöteten Maus wurden die Milz, das Pankreas und der Pankreaticoduodenal-Lymphknoten entnommen. Sie dienen zur Herstellung von organspezifischen Zellpopulationen in Suspension (s. Kap. 2.3.5.1, Kap. 2.3.5.2). Zudem wurde das freipräparierte Pankreas mit einer feinen Schere in drei Gewebeproben aufgeteilt, welche wie folgt verwendet wurden: Aus einer Probe wurde wie unter Kap. 2.3.5.3 beschrieben eine Zellsuspension hergestellt. Eine zweite Probe wurde für die qRT-PCR Analyse im Reagenzgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Gewebe der dritten Probe wurde für die Immunfluoreszenz in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet und ebenfalls mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren.

### **2.3.5.1 Milzpräparation**

Nach Tötung einer Maus durch CO<sub>2</sub> Begasung wurde die Milz entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Anschließend wurde die Milz zwischen den rauen Seiten zweier Objektträger zerrieben. Die so erhaltene Zellsuspension wurde auf ein Zellsieb pipettiert, welches anschließend mit PBS gespült wurde. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Min bei 22°C wurden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und zur Erythrozytenlyse 1:1 mit 1,6% Ammoniumchlorid-Puffer verdünnt. Für die Lyse wurden die Zellen in einem 50 ml Falconröhrchen für 5 Min bei 37°C im Wasserbad geschwenkt und anschließend bei 1200 rpm, 22°C und für 5 Min zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen wie in Kap. 2.3.1.2 gezählt und in HL-1 Medium bzw. PBS resuspendiert. Die von MCS-18 behandelten und unbehandelten Mäusen gewonnenen Zellen wurden für die FACS-Analyse bzw. für Zytokin-Elispot eingesetzt.

### **2.3.5.2 Lymphknotenpräparation**

Der Pankreaticoduodenal- Lymphknoten der NOD-Maus sowie die Axillar-, Popliteal-, Mesenterial-Lymphknoten einer BALB/C bzw. C57BL/6 Maus wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in eiskaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Lymphknoten zwischen den rauen Seiten zweier Objektträger zerrieben. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb filtriert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, wie in Kap. 2.3.1.2 gezählt und in PBS aufgenommen. Die aus dem Pankreaticoduodenal- Lymphknoten gewonnene Zellsuspension wurde wie in Kap. 2.3.6.3 beschrieben gefärbt und im FACS analysiert (s. Kap. 2.3.6.1). Die aus den Axillar-, Popliteal- und Mesenterial-Lymphknoten hergestellten Zellsuspensionen wurden in der gemischten Leukozyten-Reaktion (mixed leucocyte reaction, MLR) eingesetzt (s. Kap. 2.3.6.5)

### **2.3.5.3 Isolierung der Leukozyten aus dem Pankreasgewebe**

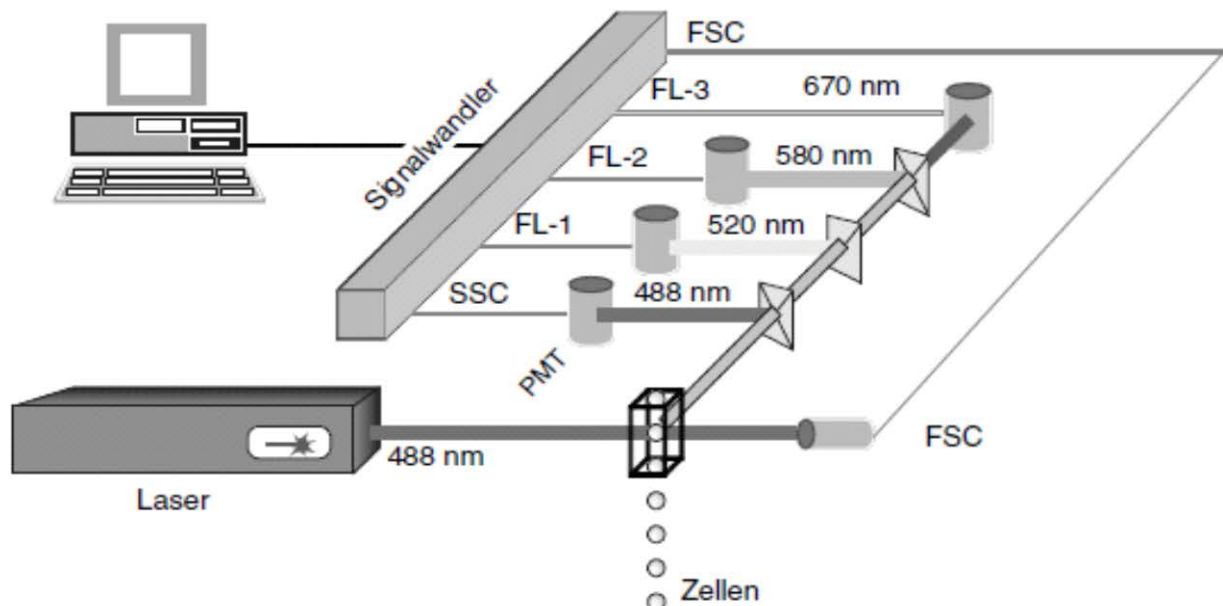
Für die FACS-Analysen wurde das Pankreas in eiskaltem PBS, welches mit 5% FCS versetzt war, sowie 56 mmol/l Glukose und Complete Mini Protease Inhibitor enthielt, in kleine Stücke zerschnitten. Das Gewebe wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 2 ml vorgewärmten PBS, das 15% FCS und Liberase CL (0,45 mg/ml) enthielt, für 25 Min bei 37°C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde eiskaltes 10% FCS in HBBS hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal durch ein Zellsieb filtriert. Abschließend wurden die Zellen wiederum zweimal mit eiskaltem 10% FCS in HBBS gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und für die FACS-Analyse vorbereitet (s. Kap. 2.3.6.3).

### **2.3.6 Immunologische Methoden**

#### **2.3.6.1 Prinzip der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie (FACS)**

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich, Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine von Zellen in Suspension semiquantitativ zu bestimmen. Für die Messung werden die zu trennenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern, die gegen bestimmte membranständige bzw. intrazelluläre antigene Strukturen gerichtet sind, markiert. Anschließend werden die in Suspension befindlichen Zellen aus dem Probenröhrchen über eine Kapillare mittels Unterdruck in die Messküvette des Geräts geleitet und in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das in dieser Arbeit verwendete FACScan besitzt als Lichtquelle einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und 15 mV Leistung, dessen Licht beim Auftreffen der Strahlen durch die in der Messküvette enthaltenen Zellen gestreut wird, wobei jeweils das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) Aufschluss über die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter,

SSC) über die Granularität der Zellen geben (Abb.8). Zusätzlich wird der jeweils an den Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der für ihn spezifischen Wellenlänge (nm) angeregt und dann Licht in einer bestimmten niederenergetischen, höheren Wellenlänge emittiert (Abb. 8). Die Emissionstärke wird durch einen Photodetektor registriert, in ein elektrisches Signal umgewandelt und an einen Computer weitergeleitet, was eine graphische Darstellung und Bearbeitung möglich macht. Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht somit Aussagen über die Expression der zu untersuchenden spezifischen Antigene in und auf der Zelle.



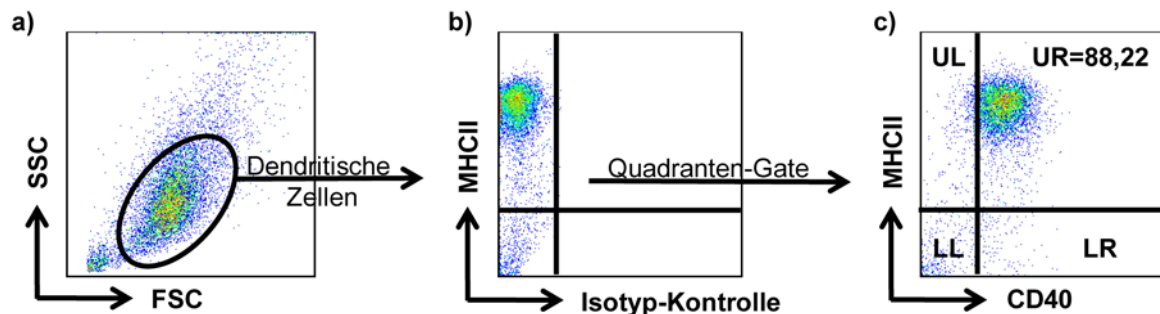
**Abb. 8: Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers (Gregor Rothe, Laborzentrum Bremen, Deutschland).** Laserlicht der Wellenlänge von 488 nm trifft auf den Probenstrom in der Messküvette. Das Licht wird gestreut und reflektiert. Die emittierte Fluoreszenz wird über Linsen und Spiegel zu den entsprechenden Detektoren (FL1 bis FL3) geleitet. Die Emissionsstärke wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und an einen Computer geleitet. Folgende Parameter können bei einer Zelle simultan bestimmt werden: FSC= forward scatter trifft die Aussage über Zellgröße. SSC= sideward scatter trifft die Aussage über Zellgranularität. FL1= Fluoreszenz 1 detektiert Fluoreszenzintensität von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit Emissionsmaximum um 520 nm. FL2= Fluoreszenz 2 detektiert Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin (PE) mit Emissionsmaximum um 580 nm. FL3= Fluoreszenz 3 detektiert Fluoreszenzintensität von Cy-Chrome mit Emissionsmaximum um 670 nm.

### **2.3.6.2 Extrazelluläre FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle muriner DZ**

Um den Einfluß von MCS-18 auf den Phenotyp von reifen murinen DZ zu untersuchen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Deshalb wurden die aus den C57BL/6-Mäusen sowie den NOD-Mäusen gewonnenen reifen DZ (s. Kap. 2.3.1.4, Kap. 2.3.1.5) auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle mittels FACS analysiert. Verwendete Antikörper für die gewonnenen DZ aus den C57BL/6-Mäusen waren MHCII, CD40, CD80, CD83, CD86 und CD11c (s. Kap. 2.2.7.4). Die DZ aus NOD-Mäusen wurden mit den Antikörpern für MHCII, CD25, CD40, CD80, CD86 sowie CD11c inkubiert. Als Isotypkontrollen wurden für die jeweiligen Antikörper die unter Kap. 2.2.7.5 aufgeführten Antikörper verwendet. Für die FACS-Analyse der DZ wurden pro Bedingung (unbehandelte (*mock*), 50 µg/ml bzw. 100 µg/l MCS18)  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Diese wurden in einem Volumen von 50 µl FACS-Puffer mit den jeweiligen Antikörpern für 30 Min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit je 400 µl FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 Min, 4°C). Um die Färbung zu fixieren wurden die Zellen mit einer 1:1 mit PBS verdünnten 2% Formaldehydlösung fixiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflusszytometer. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Flowjo Software ausgewertet. In Abb. 9 wird die Gatingstrategie für reife DZ dargestellt: Die Zellpopulation wird im FSC/SSC Modus dargestellt. Anschließend wird die DZ-Population definiert und durch das sog. „Setzen“ eines Gates eingegrenzt (Abb. 9a). In Abb. 9b sind diese eingegrenzten Zellen nach ihrer Fluoreszenz angeordnet. In diesem Beispiel sind MHCII positive Zellen (= FL2 positiv) im Gate UpperLeft (UL) dargestellt. Die aus dem UL-Gate der Abb. 9b dargestellten Zellen werden in Abb. 9c nach ihrer Fluoreszenzmarkierung für MHCII und CD40 dargestellt. Im Gate LowerLeft (LL) werden die Zellen, die weder MHCII noch CD40 exprimieren, gezeigt. Im Gate UpperLeft (UL) erscheinen die MHCII positiven aber CD40 negativen Zellen, im Gate LowerRight (LR) die CD40 positiven aber MHCII negativen Zellen und im Gate UpperRight (UR) werden die

## Material und Methoden

doppeltpositiven Zellen (für MHCII und CD40) dargestellt. Diese doppeltpositiven Zellen stellen die gesuchte Zellpopulation dar. Isotypkontrollen wurden zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des jeweiligen Antikörpers mitgeführt.



**Abb. 9: Exemplarische Darstellung der Vorgehensweise zur Auswertung von FACS-Daten für Oberflächenmarker reifer muriner DZ.** a) DZ werden im FSC/SSC Plot dargestellt. b) zeigt die nach ihrer immuncytochemischen Markierung (MHCII und der Isotyp-Kontrolle) dargestellten DZ. Die Isotypkontrolle wurde zum Ausschluß unspezifischer Bindungen für den jeweiligen Antikörper mitgeführt. c) Im Plot C wird das Gate von Plot B übernommen und die Zellen werden nach ihrer Färbung angeordnet: im Gate LowerLeft (LL) erscheinen Zellen, die weder für MHCII noch für CD40 positiv sind; im Gate UpperLeft (UL) die MHCII positiven aber CD40 negativen Zellen; das Gate LowerRight (LR) zeigt die CD40 positiven aber MHCII negativen Zellen; und im Gate UpperRight (UR) erscheinen die doppeltpositiven Zellen für MHCII und CD40.

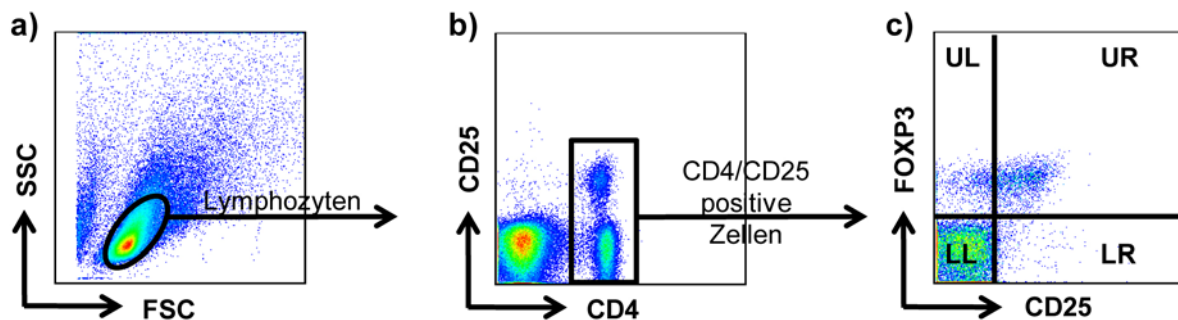
### 2.3.6.3 Intrazelluläre Foxp3-spezifische FACS-Analyse bei isolierten Zellen aus Milz, Pankreas und pankreatischen Lymphknoten

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Verabreichung von MCS-18 auf die regulatorischen T-Zellen hat, wurden den mit MCS-18 behandelten Mäusen und unbehandelten Kontrolltieren Milz, Pankreas und Pankreaticoduodenal-Lymphknoten entnommen und eine organspezifische Zellsuspension hergestellt (s. Kap. 2.3.5.1, Kap. 2.3.5.2, Kap. 2.3.5.3). Die isolierten Zellen aus Milz, Pankreas und Pankreaticoduodenal-Lymphknoten wurden mit dem anti-Maus Foxp3-Antikörper immuncytochemisch markiert. Zuvor wurden die Zellen zusätzlich extrazellulär für die Oberflächenmarker CD4 und CD25 markiert (s. Kap. 2.3.6.2). Die Fixierungs- bzw.

## Material und Methoden

Permeabilisierungslösung wurde frisch zubereitet, indem drei Teile der im Kit enthaltenen Fix/Perm-Verdünnung mit einem Teil des Fix/Perm-Konzentrats versetzt wurden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in 50 µl dieser Lösung aufgenommen und für 30 Min fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit 400 µl des verdünnten 1x Permeabilisierungspuffers gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren für 5 Min bei 1200 rpm wurden die Zellen in 50 µl Permeabilisierungspuffer mit 2% Mausserum resuspendiert und in diesem für 15 Min bei 4°C inkubiert. Danach wurde der in Permeabilisierungspuffer verdünnte, Foxp3-spezifische Antikörper auf die Zellsuspension pipettiert. Die endgültige Foxp3 Antikörperversdünnung betrug 1:100 und die Inkubationszeit belief sich auf 30 Min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen wieder mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und in normalem FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflusszytometer. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Flowjo Software ausgewertet. In Abb. 10 wird die Gatingstrategie erläutert: Die Zellpopulation wird im FSC/SSC Modus dargestellt. Anschließend wird die Lymphozytenpopulation durch das „Setzen“ eines Gates definiert (Abb. 10a). Im nächsten Schritt werden die Lymphozyten nach ihrer Fluoreszenz aufgetrennt (Abb. 10b). Die CD4 und CD25 positiven Zellen werden durch ein Gate eingegrenzt und in Abb. 10c nach ihrer immunocytochemischen Markierung für Foxp3 und CD25 dargestellt. Im Gate LowerLeft (LL) werden die Zellen, die weder Foxp3 noch CD25 exprimieren, gezeigt. Im Gate UpperLeft (UL) erscheinen die Foxp3 positiven aber CD25 negativen Zellen, im Gate LowerRight (LR) die CD25 positiven aber Foxp3 negativen Zellen und im Gate UpperRight (UR) werden die doppelt positiven Zellen für Foxp3 und CD25 dargestellt. Diese doppelt positiven Zellen zeigen die gesuchte Zellpopulation.





**Abb. 10: Exemplarische Darstellung der Vorgehensweise zur Auswertung von FACS-Daten für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dreifachpositive regulatorische T-Zellpopulationen in Milz, Pankreas und pankreatoduodenal Lymphknoten.** a) Zuerst werden die Lymphozyten im FSC/SSC Plot dargestellt. In b) werden diese Lymphozyten gemäß ihrer immuncytochemischen Markierung (CD4 und/oder CD25) dargestellt. c) Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden nach ihrer immuncytochemischen Markierung folgendermaßen dargestellt: das Gate LL (LowerLeft) zeigt CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die weder Foxp3 noch CD25 exprimieren; im Gate UL (UpperLeft) erscheinen die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> aber CD25 negativen T-Zelle; im Gate LR (LowerRight) die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> aber Foxp3 negativen T-Zellen und im Gate UR (UpperRight) wird die gesuchte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellpopulation dargestellt.

### 2.3.6.4 Apoptose-/Nekrosefärbung

Um toxische Effekte von MCS-18 auf die murinen DZ auszuschließen, wurde eine Annexin V- und Propidiumiodid Färbung durchgeführt. Während der Apoptose kommt es zu einer Kondensation des Chromatins und anschließender Ausstülpung (=blebbing) der Zellmembran (Cline and Radic, 2004), sodass das Innere der Zellmembran, zytoplasmatische Strukturen sowie Zellkernkomponenten auf der Zelloberfläche der sterbenden Zelle erscheinen (Casciola-Rosen *et al.*, 1994). Annexin V bindet kalziumabhängig an die nach außen gelangten, negativ geladenen Phospholipide der inneren Zellmembran (Gerke and Moss, 2002). Um die apoptotischen Zellen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurde gleichzeitig eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Da im Gegensatz zu apoptotischen Zellen die Zellmembran bei nekrotischen Zellen durchlässig wird, kann Propidiumiodid (PJ) in die Zelle eindringen und sich als interkalierendes Agens in die DNA einlagern. Frühapoptische Zellen sind demnach Annexin V positiv und PJ negativ, wohingegen nekrotische Zellen Annexin V negativ und PJ positiv sind. Für

## Material und Methoden

die Apoptose-Färbung wurde das FITC Annexin V Detection Kit (BD, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden mit 1,25 µl Annexin V in 50 µl 1x Bindungspuffer aufgenommen, was einer Verdünnung von 1:40 entspricht, und für 10 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 400 µl 1x Bindungspuffer gewaschen, in 50 µl PBS resuspendiert und mit 2,5 µl PJ (50µg/ml) gefärbt. Somit ergab sich eine PJ-Verdünnung von 1:20. Die Messung erfolgte für Annexin V bei einer Wellenlänge von 525 nm bzw. 617 nm (PJ), mittels Durchflusszytometer innerhalb von 30 Min.

### **2.3.6.5 Allogene T-Zell Proliferation/mixed leucocyte reaction (MLR)**

Die gemischte Leukozyten-Reaktion (mixed leucocyte reaction, MLR) dient als funktioneller Test, um die Fähigkeit von DZ, allogene T-Zellen mitotisch zu stimulieren, quantitativ zu erfassen (Bedford *et al.*, 1999; Steinman and Witmer, 1978). Die Stimulation der T-Zellen wird anhand ihrer Proliferation gemessen. Durch den Einbau von radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin kann die Stärke der Proliferation ermittelt werden.

Aus murinem Knochenmark einer NOD- bzw. C57BL/6-Maus wurden DZ, wie in Kap. 2.3.1.4 beschrieben, isoliert und entweder in An- oder Abwesenheit von MCS-18 (mock, 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml MCS-18) mittels TNF-α gereift. Nach 24 Std wurden diese in titrierter Zellzahl (30000, 10000, 3000, 1000, 0) als Triplikate in eine 96-Loch-Flachbodenplatte zusammen mit jeweils  $4 \times 10^5$  Lymphozyten, isoliert aus den Lymphknoten einer C57BL/6- bzw. BALB/C-Maus, in MLR-Medium ausgesät und für 72 Std inkubiert. Lymphozyten bzw. MLR-Medium allein dienten als Kontrollen.

Die DNA-Neusynthese erfolgt proportional zur Proliferation von Zellen. Durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die DNA wurde die Bestimmung der Zellproliferation über die Messung der eingebauten Radioaktivität ermöglicht. Nach Lyse der Zellen durch Zugabe von destilliertem Wasser wurde die DNA freigesetzt und auf Glasfaserfiltern aufgefangen. Die Bestimmung des radioaktiven Zerfalls pro Minute (cpm) diene als direktes Maß für den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die DNA und somit für die

## Material und Methoden

Proliferation der Zellen. Gemessen wurde dies mit Hilfe eines Szintillationszählers. Das Prinzip eines Szintillationszählers besteht in der Emission von Photonen in Folge der Wechselwirkung ionisierender Teilchen (in diesem Fall die  $\beta$ -Strahlen des  $^3\text{H}$ ) mit den Molekülen eines sogenannten Szintillators. Die Lumineszenz des Szintillators wird über einen Photomultiplier verstärkt und ist direkt proportional zur  $\beta$ -Strahlung der Probe. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Std wurde jeweils 1  $\mu\text{Ci}$  von  $^3\text{H}$ -Thymidin pro Well zu der Zellsuspension gegeben, die Zellen für weitere 16 Std inkubiert und anschließend die Kulturen mit einem „Harvester“ auf einen Glasfaserfilter übertragen. Anschließend wurde der Filter getrocknet und mit Szintillationswachs versiegelt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler gemessen.

Aus den Triplikaten wurden die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der Radioaktivitäten in „counts per minute“ (cpm) ermittelt, wodurch eine graphische Darstellung in Abhängigkeit zur eingesetzten MCS-18 Konzentration möglich war. Die Hintergrundaktivität, welche durch DZ und T Zellen allein bzw. MLR-Medium bestimmt wurde, lag zwischen 0 und 200 cpm und wurde vernachlässigt.

### 2.3.6.6 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Für die quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgM und IgG2b in Zellkulturüberständen wurde das kommerziell erhältliche ELISA-Kit OptEIA™ verwendet. Für die Bestimmung der Konzentration des Zytokins IL-1 $\beta$  wurde das R&D Duo Set ELISA-Kit verwendet. Für jeden Antikörper- bzw. Zytokinnachweis wurde eine Referenzstandardreihe mit sieben Standards erstellt (Tab. 3). Sowohl die Standards als auch die einzelnen Proben wurden als Duplikate pipettiert. Für die einzelnen Waschschrte wurde ein „Columbus-Washer“ benutzt. Das Prinzip des so genannten Sandwich-ELISA beruht darauf, dass der Zellkulturüberstand in die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert wird, deren Boden zuvor mit einem für das jeweilige Zytokin bzw. Immunglobulin spezifischen Antikörper (coating Antikörper) beschichtet worden ist. Ist das Zytokin bzw. Immunglobulin im Überstand

## Material und Methoden

vorhanden, bindet es an diesen Antikörper. Die spezifische Antikörperbindung wird im ELISA-Assay mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Hierzu wurde das gebundene Zytokin bzw. Immunglobulin mit einem zweiten, ebenfalls antigenspezifischen Detektionsantikörper markiert. Dieser Detektionsantikörper ist mit Biotin konjugiert und kann mit der an Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) nachgewiesen werden. Durch die enzymatische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase kann das zugegebene Substrat umgesetzt werden und es kommt zu einer Farbreaktion (blau). Die Farbreaktion wurde nach ca. 20-30 Min durch Zugabe von 1N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt (Farbumschlag nach gelb) (Abb. 11). Die umgesetzte Substratmenge und damit die Intensität der Farbe ist proportional zur Molekül-Konzentration in der Probe. Die Messung der Intensität der Färbung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers. Anhand von Referenzstandards konnte die Konzentration der Immunglobuline bzw. Zytokine in den gemessenen Proben durch lineare Regressionsanalyse bestimmt werden.

Zytokine	niedrigste Konzentration	höchste Konzentration
IgM	31,5 ng/ml	2000 ng/ml
IgG2b	31,5 ng/ml	2000 ng/ml
IL-1β	15,6 pg/ml	1000 pg/ml

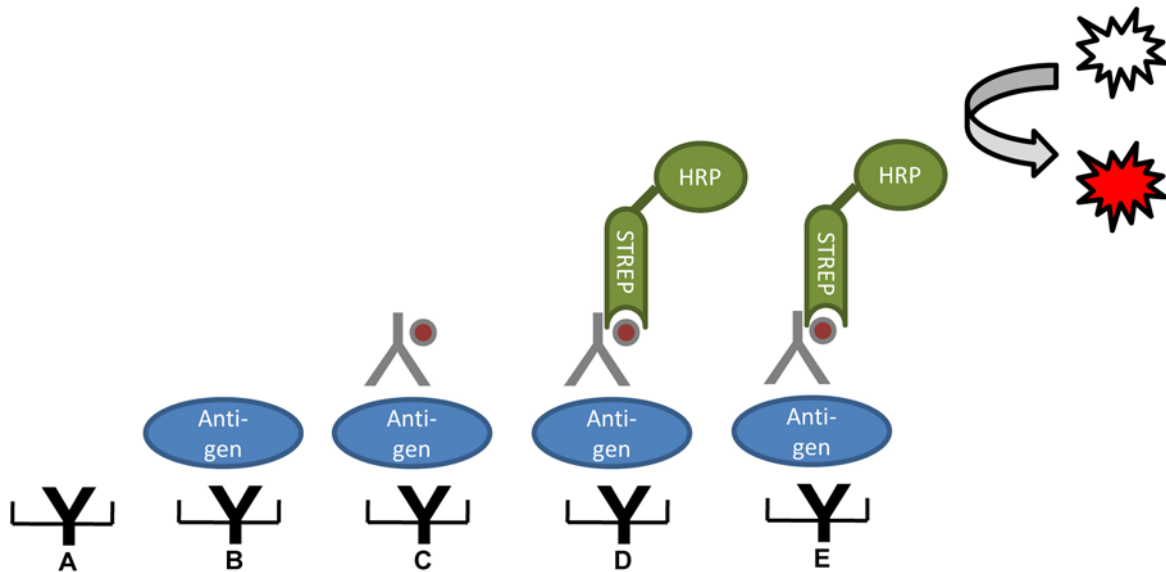
**Tab. 3: Referenzstandards für Maus-ELISAs.** Für den Antikörperrnachweis (IgM bzw. IgG2b) und Zytokinnachweis (IL-1β) wurde bei jedem durchgeführten ELISA eine Referenzstandardreihe angefertigt. Für den Antikörperrnachweis wies die Standardreihe folgende Konzentrationen auf: 2000 ng/ml, 1000ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,5 ng/ml und 0 ng/ml bzw. für den Zytokinnachweis 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 0 pg/ml. Verwendete Abkürzungen: IgM: Immunglobulin M, IgG2b: Immunglobulin G2b, IL-1β: Interleukin 1 beta;

Für die Bestimmung der jeweiligen IgM- und IgG2b- Konzentration wurden 20 µl des jeweiligen coating Antikörpers anti-IgM bzw. anti-IgG2b mit 5 ml PBS verdünnt (1:250) zu je 50 µl in jedes Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte für eine Std bei 37°C oder im Kühlschrank bei 4°C über Nacht. Im Anschluß wurden die Platten dreimal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen (100 µl/Well). Um unspezifische

## Material und Methoden

Bindungen abzusättigen, wurde der Blocking-Puffer (10% FCS in PBS) zu je 100 µl pro Well dazugegeben und bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift der Platte (dreimal 100µl/Well 0,05% Tween-20 in PBS) wurden Standards bzw. die Proben zu je 50 µl/Well in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Es folgte nach einer Inkubation von eine Std bei Raumtemperatur ein erneutes dreimaliges Waschen der Platte (s.o) und die Zugabe der mit Biotin gekoppelten Detektionsantikörper anti-Maus-IgM bzw. anti-Maus-IgG2b. Diese Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml in Blocking-Puffer verdünnt (50 µl/Well). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für zwei Std. Danach wurde sechsmal gewaschen und anschließend jeweils 50 µl Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:2000 in Blocking-Puffer in jedes Well gegeben und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde die Platte mit 100µl/Well Substrat, das aus den im Kit enthaltenen Lösungen A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und B (TMB) im Mischungsverhältnis 1:1 hergestellt wurde, für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische HRP-Reaktion wurde mit 50 µl 1N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt und die Färbung mittels ELISA-Reader bei einer optischen Densität von 450 nm quantifiziert. Für die Bestimmung der IL-1β Konzentration wurde der coating Antikörper anti-Maus IL-1β in einer Konzentration von 4 µg/ml in PBS zu je 50 µl/Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Im Anschluß daran wurden die Platten dreimal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen (100 µl/Well). Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde der Blocking-Puffer (1% FKS, 5% Saccharose, 0,05% NaN<sub>3</sub> in PBS) zu je 100 µl pro Well dazugegeben und bei Raumtemperatur für eine Std inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift der Platte (dreimal 100 µl/Well 0,05% Tween-20 in PBS) wurden die Standards bzw. die Proben zu je 50 µl/Well in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Es folgte nach einer Inkubation von zwei Std bei Raumtemperatur ein erneutes dreimaliges Waschen der Platte (s.o) und die Zugabe des mit Biotin gekoppelten Detektionsantikörpers anti-Maus IL-1β (100 ng/ml). Danach wurde sechsmal gewaschen und anschließend jeweils 50 µl Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:2000 in Blocking-Puffer in jedes Well gegeben und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

sechsmaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl/Well Substrat, das aus den im Kit enthaltenen Lösungen A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und B (TMB) im Mischungsverhältnis 1:1 hergestellt wurde, für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische HRP-Reaktion wurde mit 50 µl 1N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gestoppt und die Färbung mittels ELISA-Reader bei einer optischen Densität von 450 nm quantifiziert.



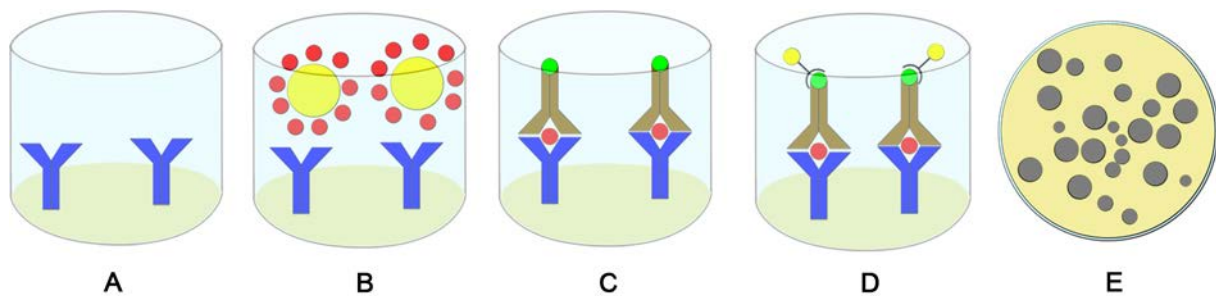
**Abb. 11: Sandwich ELISA** A) Mit capture-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte; B) Zugabe der Proben mit darin enthaltenem Antigen; C) Zugabe des biotinylierten Detektions-Antikörpers; D) Zugabe und Komplexbildung des Enzym (HRP)-gebundenen Streptavidin mit dem Biotin des Detektionsantikörpers E) Zugabe von Substrat, welches zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

### 2.3.6.7 Elispot-Assay

Um den Einfluß der MCS-18 Behandlung auf die mit der Th1-Immunantwort assoziierten Zytokinsekretion (z.B.  $\text{IFN-}\gamma$ ) zu untersuchen, wurden Elispot-Analysen durchgeführt. Der Elispot-Assay ist eine schnelle und hochempfindliche Methode, die eine quantitative Aussage über die Zytokinsekretion antigenspezifischer T-Zellen erlaubt. Die T-Zellen werden mit spezifischen Antigenen in einer Mikrotiterplatte stimuliert. Die Platte ist mit monoklonalen Antikörpern gegen das zu untersuchende Zytokin beschichtet. Nach Freisetzung des Zytokins wird dieses vom Antikörper

## Material und Methoden

gebunden und mit einem zweiten zytokinspezifischen Antikörper nachgewiesen. Im Well entsteht ein farbiges Reaktionsprodukt, der sog. Spot (Abb. 12).



**Abb. 12: Schematische Darstellung des Elispot-Assays** **A)** Mit monoklonalen Antikörper gegen das zu testende Zytokin beschichtete Mikrotiterplatte; **B)** 500.000 Zellen (gelb) werden für 24 Stunden mit spezifischen Antigen stimuliert und produzieren das Zytokin (rot); **C)** Inkubation mit einem ebenfalls gegen das zu detektierende Zytokin gerichteten biotinylierten zweiten Antikörper; **D)** Zugabe Streptavidin-konjugierter Enzyme **E)** Auswertung mit Hilfe eines automatischen Bildanalysesystems

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten aus den Milzen von mit MCS-18 behandelten und unbehandelten NOD-Mäusen im Elispot-Assay eingesetzt. Die Lymphozyten wurden mit Autoantigenen (s. Kap. 2.2.7.10) stimuliert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Es wurden Mikrotiterplatten der Firma Mabtech verwendet, welche bereits mit IFN- $\gamma$  spezifischen Antikörpern beschichtet (sog. precoated plates) waren. Diese wurden fünfmal mit PBS (200  $\mu$ l/Well) gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l/Well Elispot-Medium für eine Std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in 200  $\mu$ l Elispot-Medium aufgenommen und in die 96-Wellplatte überführt. Zur Stimulation der Zellen dienten die in 2.2.7.10 aufgeführten Peptide. Alle Peptide wurden in einer Endkonzentration von 40  $\mu$ g/ml eingesetzt. Die Platten wurden dann für 24 Std bei 37°C in 5,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welchen kein Peptid zugesetzt wurde. Nach 5-maligem Waschen mit PBS folgte die Zugabe des zweiten biotinylierten und ebenfalls IFN- $\gamma$  spezifischen Antikörpers und eine Inkubation für zwei Std bei Raumtemperatur. Nach erneutem 5-maligem Waschen mit PBS und anschließender Zugabe von 100  $\mu$ l an alkalische Phosphatase konjugiertes

## Material und Methoden

Streptavidin (1:1000 verdünnt in PBS), welches an das Biotin bindet, bildet sich während der Inkubation (60 Min) bei RT ein enzymgekoppelter Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex. Anschließend wurden 100 µl des Farbstoffsubstrats BCIP/NBT-plus in die Wells pipettiert. Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte bei RT für 5 Min. Die Entwicklung wurde durch dreimaliges Waschen der Platte mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Im Anschluss wurden die Platten luftgetrocknet und bis zur Analyse im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Auswertung der ELISPOT-Experimente erfolgte automatisch mit dem KS ELISPOT-System Version 4.2.0 der Firma Zeiss, Jena, Deutschland. Das System besteht aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofokus. Jede einzelne Testeinheit (TE) der Elispotplatte wurde vom Motortisch präzise angesteuert (Abb. 13). Eine angeschlossene Farbkamera nahm die Zytokinspots auf, die digitalisiert und anschließend durch die KS ELISPOT-Software ausgewertet wurden. Die Hintergrundreaktivität der Zellen ohne Peptid wurde abgezogen.



**Abb. 13: Darstellung eines Elispot Reader (Zeiss, Jena, Deutschland).** Für die automatische Auswertung des Elispots wird der Elispot auf den Motortisch platziert. Mittels Auflichtmikroskops wird jedes Well erfasst und die einzelnen Zytokinspots von einer Farbkamera aufgenommen.



### 2.3.6.8 Cytometric bead array (CBA)

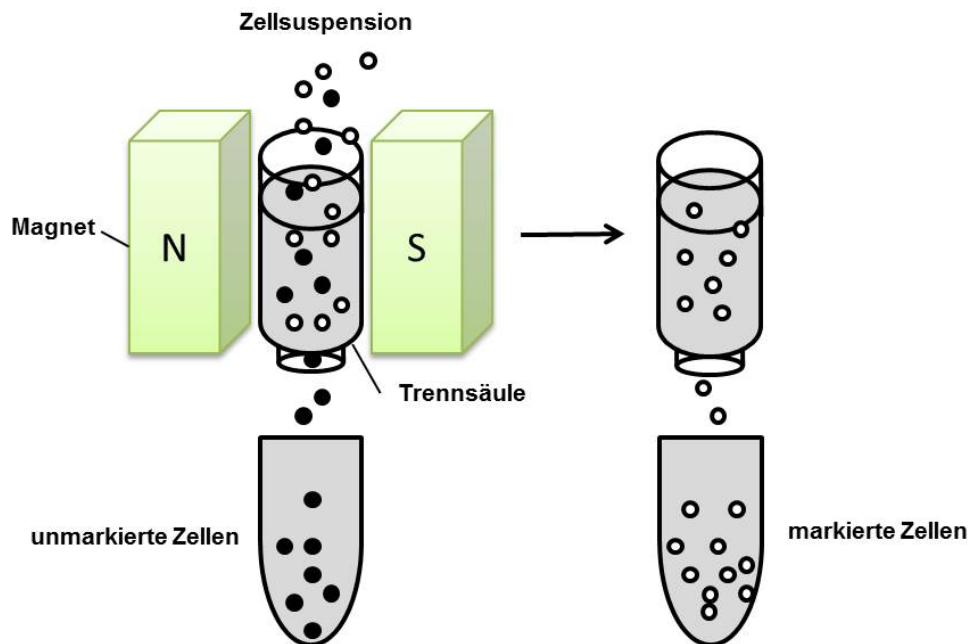
Während der Kultivierung der DZ mit MCS-18 und Reifungsstimuli kommt es zur Sekretion verschiedener löslicher Zytokine. Diese werden in den Zellkulturüberstand abgegeben. Mit Hilfe des Cytometric Bead Array (CBA) können gleichzeitig mehrere Zytokine bzw. Chemokine dieser Kulturüberstände quantitativ bestimmt werden. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Polystyrol-Kügelchen, sogenannte beads, die mit primären Antikörpern über deren Fc-Komponente gekoppelt sind, verwendet. Die Detektion erfolgt nach der Bindung des Antigens an den Primärantikörper über einen sekundären Antikörper, der seinerseits mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Die beads können durchflusszytometrisch anhand ihrer Fluoreszenzintensität unterschieden werden. Die Zytokinkonzentration wird durch die Fluoreszenzintensität des gebundenen Sekundärantikörpers und im Vergleich zu einer Standardkurve mit bekannten Zytokinkonzentrationen bestimmt.

Die Konzentration der Zytokine IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70 und des Chemokins MCP-1 aus den Kulturüberständen der mit LPS gereiften und MCS-18 behandelten DZ wurde mittels CBA bestimmt. Hierzu wurden die im Kit enthaltenen lyophilisierten Standards in jeweils 2 ml assay diluent über 15 Min bei Raumtemperatur gelöst und anschließend eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256) hergestellt. Reines assay diluent diente als Negativkontrolle. Die Konzentration der Standardreihe (20 pg/ml bis 5000 pg/ml) bezieht sich auf jedes der sechs Zyto- bzw. Chemokine. Zur Messung wurden 10  $\mu$ l bead-Mix und 10  $\mu$ l PE-Detektions-Reagenz in FACS-Röhrchen vorgelegt und 10  $\mu$ l Standard bzw. Probe zugefügt. Nach einer Inkubation von zwei Std bei RT im Dunkeln wurden die Proben mit 300  $\mu$ l Waschpuffer verdünnt und anschließend zentrifugiert (5 Min, 1200 rpm). Danach wurde der Überstand vorsichtig aspiriert, verworfen und das Pellet in 300  $\mu$ l Waschpuffer aufgenommen. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometer. Die Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen wurde mit der Flowjo Software ermittelt.

### 2.3.6.9 Magnetische Zellsortierung (MACS) zur Isolierung von B-Lymphozyten

Um zu untersuchen, welchen Einfluß MCS-18 auf die Proliferation von B-Zellen hat, wurden B-Zellen aus der Milz von Mäusen isoliert. Zur Isolierung von B-Zellen wurde das magnetische Zellsortierungssystem (MACS, magnetic activated cell sorting) verwendet. Bei dieser Trennmethode werden sog. MACS MicroBeads (Durchmesser ca. 50 nm) eingesetzt. Diese superparamagnetischen Partikel, an die monoklonale Antikörper über deren Fc-Komponente gebunden sind, können spezifische Oberflächenantigene binden. Durch ein starkes magnetisches Feld (MACS Magnetplatte) und MACS Separationssäulen ist es möglich, die spezifisch markierten Zellen aufgrund ihrer indirekt magnetischen Eigenschaften zu trennen. Das Grundgerüst der Separationssäule besteht aus ferromagnetischen Kügelchen, welche mit einem zellfreundlichen Kunststoff überzogen sind. In der Separationssäule werden die mit den MicroBeads beladenen Zellen durch die magnetische Anziehung in der Säule gehalten (positive Selektion) und von den nicht markierten Zellen getrennt (negative Selektion). Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld können die markierten Zellen eluiert werden (Abb. 14).

Die aus der Milz von C57BL/6-Mäusen gewonnenen Zellen (s. Kap. 2.3.5.1) wurden in MACS-Puffer in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen pro 90  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen. Die CD19 MicroBeads (10  $\mu$ l pro  $1 \times 10^7$  Zellen) wurden zugesetzt und der Ansatz für 15 Min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml MACS-Puffer abgestoppt. In der Zwischenzeit wurde die MACS-Säule mit 3 ml MACS-Puffer in einer MACS Magnetplatte äquilibriert. Nach dem Abzentrifugieren der mit beads beladenen Zellen (10 Min bei 1200 rpm) wurden diese in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säulen pipettiert. Anschließend wurden sie dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und nach Entnahme aus dem Magnetfeld mit 3 ml MACS-Puffer herausgespült.



**Abb. 14: Prinzip der magnetischen Zellsortierung.** Die mit MicroBeads beladenen Zellen werden durch das magnetische Feld in der Trennsäule zurückgehalten und von den unmarkierten Zellen getrennt. Die markierten Zellen können nach Entfernen des magnetischen Feldes von der Trennsäule eluiert werden.

Um die Separation  $CD19^+$  B-Zellen zu kontrollieren, wurde die Probe nach der magnetischen Separation mit einem anti-Maus B220-Antikörper (s. Kap. 2.2.7.4) immunocytochemisch markiert und mittels FACS-Analyse überprüft. Es konnte eine Reinheit von  $>95\%$  erzielt werden.

### 2.3.7 Molekularbiologische Methoden

Um einen Einblick in die Genexpression von Insulin 1, Insulin 2, sowie IFN- $\gamma$  und Foxp3 spezifischen mRNAs der mit MCS-18 behandelten Tiergruppen sowie der unbehandelten Kontrollgruppe zu erhalten, wurde das Pankreasgewebe entnommen (s. Kap. 2.3.5) und die daraus gewonnene RNA mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

### 2.3.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini-Kit, der QIA shredder spin columns und des RNase-Free DNase-Kits. Das murine Pankreasgewebe wurde in 600 µl RLT- Lysepuffer aus dem RNeasy mini-Kit und 20 µl Dithiotreitol (DTT) einer Konzentration von 2 mM aufgenommen und in die Percellys-Keramik-Kit tubes überführt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte durch die Bio 101 ThermoSavant-Fuge. Hierbei wird durch starkes Schütteln das Gewebe durch die Keramikugeln zerkleinert. Nach Zentrifugation der tubes für zwei Min bei 13000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und auf die QIA shredder spin columns überführt. Nach erneutem Zentrifugieren (zwei Min bei 13000 rpm) wurde zum Lysat das äquivalente Volumen an 70% Ethanol zugegeben. Anschließend wurden max. 700 µl des Lysats auf RNA-bindende Säulen gegeben, an deren Silica-Gel-Matrix die RNA-Moleküle binden. Die anderen Bestandteile des Lysats wurden durch Zentrifugation bei 11000 rpm für 15 Sek und durch Waschen mit im Kit enthaltenen Waschpuffern entfernt. Die Elution der RNA erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser mit einer abschließenden Zentrifugation bei 11000 rpm für 60 Sek.

### 2.3.7.2 Photometrische Bestimmung der RNA - Konzentration

Die Messung der RNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop durchgeführt. Dabei wird die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Die Absorption bei 260 nm spiegelt dabei die Nukleinsäurekonzentration wider, die Absorption bei 280 nm die der Proteine. Das Verhältnis dieser beiden Messungen zeigt die Reinheit der Probe an, wobei ein Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,8 - 2,0 anzustreben ist. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 2.3.7.3 cDNA-Synthese

Für Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene muss die eingesetzte RNA zunächst enzymatisch mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase ist eine retrovirale, RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die virale RNA in eine komplementäre DNA-Sequenz umschreibt, welche anschließend in die DNA der Wirtszelle integrieren kann.

Die cDNA wurde mittels First Strand cDNA Synthese-Kit wie folgt hergestellt: Zu jeweils 1 µg RNA in 10 µl DEPEC-H<sub>2</sub>O wurde 1 µl des Random Hexamer Primers zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 Min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock® Ribonuclease Inhibitor, 2 µl dNTPs und 2 µl M-MuLV reverse Transkriptase hinzugefügt. Das ergab ein Volumen von 20 µl je Probe. Im Peltier Thermal Cycler erfolgte die reverse Transkription der mRNA zu cDNA nach folgendem Protokoll: 5 Min bei 25°C, 60 Min bei 37°C und 10 Min bei 70°C. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.3.7.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)

Das Pankreas aus den mit MCS-18 behandelten und unbehandelten NOD-Mäusen wurde, wie in Kap. 2.3.5 beschrieben, entnommen und auf und die mRNA Expression der Gene Insulin 1, Insulin 2 sowie IFN-γ und Foxp3 mittels quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde das LightCycler™ System verwendet. Bei diesem System wird der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green eingesetzt. Hierbei können PCR Produkte während der Amplifikation erfasst werden. SYBR Green bindet ausschließlich an die doppelsträngige DNA der hybridisierten Primer und an die durch die TaqPolymerase synthetisierte dsDNA. Die in gebundenem Zustand emittierte Fluoreszenz wird durch den LightCycler™ aufgezeichnet. Die Quantifizierung erfolgt über die Korrelation der

## Material und Methoden

Fluoreszenz mit der bekannten Kopienzahl eines Standards. Hierzu wird der Fluoreszenzschwellenwert, der sog. CT-Wert (threshold cycle) herangezogen. Der CT-Wert charakterisiert den PCR-Zyklus, bei dem das emittierte Licht erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Mit Hilfe einer Standardkurve kann das zu untersuchende Transkript quantifiziert werden. Die auf die Amplifikationszyklen folgende Schmelzanalyse (Erhitzung von 60°C auf 95°C) nutzt den spezifischen Schmelzpunkt eines definierten DNA-Fragments aus. Dieser Vorgang wird ebenfalls photoelektrisch dokumentiert und liefert Aufschluss über amplifizierte Nebenprodukte. Eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit bei geringem Kontaminationsrisiko durch den LightCycler<sup>TM</sup> spezifischen PCR Kit stellt ebenso einen Vorteil dieser Methode dar, wie die zeitsparende Analyse. Um auszuschließen, dass das Ergebnis der Analyse durch unterschiedliche cDNA-Mengen in den Proben verfälscht wird, wurde für die Berechnung und statistische Auswertung das nichtregulierte Housekeeping-Gen für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) herangezogen. Bei jeder PCR wurde parallel eine Negativkontrolle eingesetzt, die mit ddH<sub>2</sub>O statt mit cDNA durchgeführt wurde. Die Reaktionsgemische wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach folgenden Pipettierschema angesetzt:

Produkt	Volumen (µl)
SYBR <sup>®</sup> Green Master-Mix	10 µl
Vorwärts Primer	1 µl
Rückwärts Primer	1 µl
cDNA	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl
Gesamtvolumen	20 µl

**Tab. 4: Ansatz eines Reaktionsgemischs für eine LightCycler<sup>TM</sup> Probe**

## Material und Methoden

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	15 Min	1
Amplifikation			
Denaturierung	94°C	15 Sek	50
Annealing der Primer	58°C	15 Sek	
Elongation	72°C	15 Sek	
Schmelzung der Produkte	65°C-95°C	0,1°C/s	1
Kühlung	40°C RT	30 Sek	1

**Tab. 5: RT-PCR Protokoll**

### 2.3.8 Histologische Methoden

#### 2.3.8.1 Anfertigung der murinen Pankreasgefrierschnitte

Um die Leukozyteninfiltration in den Langerhans'schen Inseln histologisch darzustellen, wurde jeweils das Pankreas der diabetischen bzw. protektierten Mäusen isoliert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Proben wurden in Tissue-Tek® eingebettet, und mit einem Kryotom wurden bei -20°C Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt. Die auf Objektträger verbrachten Schnitte wurden bis zur immunhistochemischen Markierung bei -20°C gelagert.

#### 2.3.8.2 Immunhistochemische Analyse der Gefrierschnitte

Für den immunhistochemischen Nachweis spezifischer Antigene (Insulin, CD4, CD8, Foxp3) im Pankreasgewebe wurden die Gewebeschnitte zunächst für 10 Min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend bei RT für 20 Min luftgetrocknet. Mit einem Fettstift (Dakopen) wurden die Gewebeschnitte umrahmt, um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Schnitte wurden mit 3% BSA in PBS für 15 Min bei Raumtemperatur versetzt, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu

## Material und Methoden

verhindern. Außerdem wurde der Avidin-Biotin Blocking Kit von Vector verwendet, um das vom exokrinen Pankreas produzierte Biotin zu blocken. Die Inkubation mit den primären Antikörpern (s. Kap. 2.2.7.6) erfolgte für zwei Std bei RT. Hierzu wurden die Antikörper in jeweils 1% BSA in PBS in der entsprechenden Verdünnung angesetzt und 50 µl auf jeden Schnitt pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte mit eiskaltem PBS dreimal für je 5 Min gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte mit den sekundären Antikörpern, in der jeweiligen Verdünnung (s. Kap. 2.2.7.7), für 60 Min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss dreimal für je 5 Min in eiskaltem PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit dem in Kap. 2.2.7.8 aufgeführten Streptavidin-Konjugat, sowie mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:1000) für die Kernfärbung, für 30 Min inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit eiskaltem PBS für je 5 Min wurden die Schnitte mit Eindeckmedium und einem Deckglas versehen. Die Aufbewahrung der Schnitte bis zum Mikroskopieren erfolgte bei 4°C.

### **2.3.8.3 Fluoreszenzmikroskopie**

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können zelluläre, mit spezifischen Antikörpern markierte Antigene in bzw. auf fixierten Zellen und Geweben aufgrund des unter 2.3.8.2 beschriebenen Verfahrens im Fluoreszenzmikroskop indirekt sichtbar gemacht, und deren Lokalisation sowie Expressionsdichte qualitativ ausgewertet werden. Ähnlich wie bei der Durchflusszytometrie wird dabei der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht durch einen Filter geleitet, der nur für Licht der jeweils emittierten Wellenlänge durchlässig ist. Die Fotodokumentation erfolgt mittels einer im Mikroskop integrierten Kamera.



### 2.3.9 Statistische Analyse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse sowie die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 5.02 durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende statistische Tests verwendet: Die Überlebenskurve der NOD-Mäuse, dargestellt nach Kaplan Meier, wurde mittels Log-Rank-Test auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Bei Vergleich von Mittelwerten aus zwei unabhängigen Stichproben wurde entweder der Mann-Whitney U-Test (nicht parametrisch) angewandt oder der Student's T-Test (parametrisch). Als Nullhypothese wird definiert, dass sich die unterschiedlichen Gruppen (behandelt/unbehandelt) bezüglich der untersuchten Parameter nicht unterscheiden. Als Alternativhypothese wird definiert, dass sich die unterschiedlichen Gruppen (behandelt/unbehandelt) bezüglich der untersuchten Parameter unterscheiden. Eine Zunahme oder Abnahme des Wertes (behandelt/unbehandelt) wurde als nicht zufällig, also als signifikant angesehen, wenn das Signifikanzniveau  $< 0,05$  betrug. Die Signifikanzgrenzen betrugen:  $p < 0,05$  signifikant,  $p < 0,01$  hoch signifikant und  $p < 0,001$  höchst signifikant.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von MCS-18 auf murine DZ von C57BL/6-Mäusen

In der Arbeit von Horstmann *et al.* (2007) konnte erstmals gezeigt werden, dass MCS-18 die Expression spezifischer Oberflächenmarker auf humanen DZ inhibiert. In welchem Umfang MCS-18 auch einen Effekt auf murine DZ, isoliert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen, hat, wurde in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

#### 3.1.1 MCS-18 inhibiert die Expression DZ-spezifischer Oberflächenmoleküle

Um den Einfluss von MCS-18 auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker muriner DZ zu untersuchen, wurden die Zellen mittels FACS-Analyse phänotypisch charakterisiert (s. Kap. 2.3.6.2). Die Zellen wurden deshalb *in vitro* in An- bzw. Abwesenheit von MCS-18 mit LPS, TNF- $\alpha$  oder LPS+anti-CD40 (s. Kap. 2.2.7.1) am Tag 8 stimuliert und 24 Stunden später einer FACS-Analyse unterzogen. Durch die CD40 Ligation mittels anti-CD40 kann eine DZ Reifung induziert werden (Cella *et al.*, 1996) In Kombination mit LPS wurde deshalb anti-CD40 als zusätzlicher Reifungsstimulus für DZ eingesetzt. Als Kontrolle dienten unstimulierte DZ. Die in Abb. 15 dargestellten Säulendiagramme repräsentieren die Ergebnisse eines Einzelversuchs. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Versuchen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) genannt. Die ermittelten Werte in Prozent (%) beziehen sich auf die Gesamtzahl der im FACS analysierten Zellen. Die Expression von CD83 lag bei unstimulierten, unbehandelten Zellen (mock) bei  $43,6 \pm 13,0\%$ . Diese unstimulierten DZ exprimierten bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18  $35,6 \pm 16,8\%$  CD83 und  $31,7 \pm 18,5\%$  bei einer Inkubation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18. Bei den unstimulierten DZ ließ sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der CD83 Expression (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 und mock

## Ergebnisse

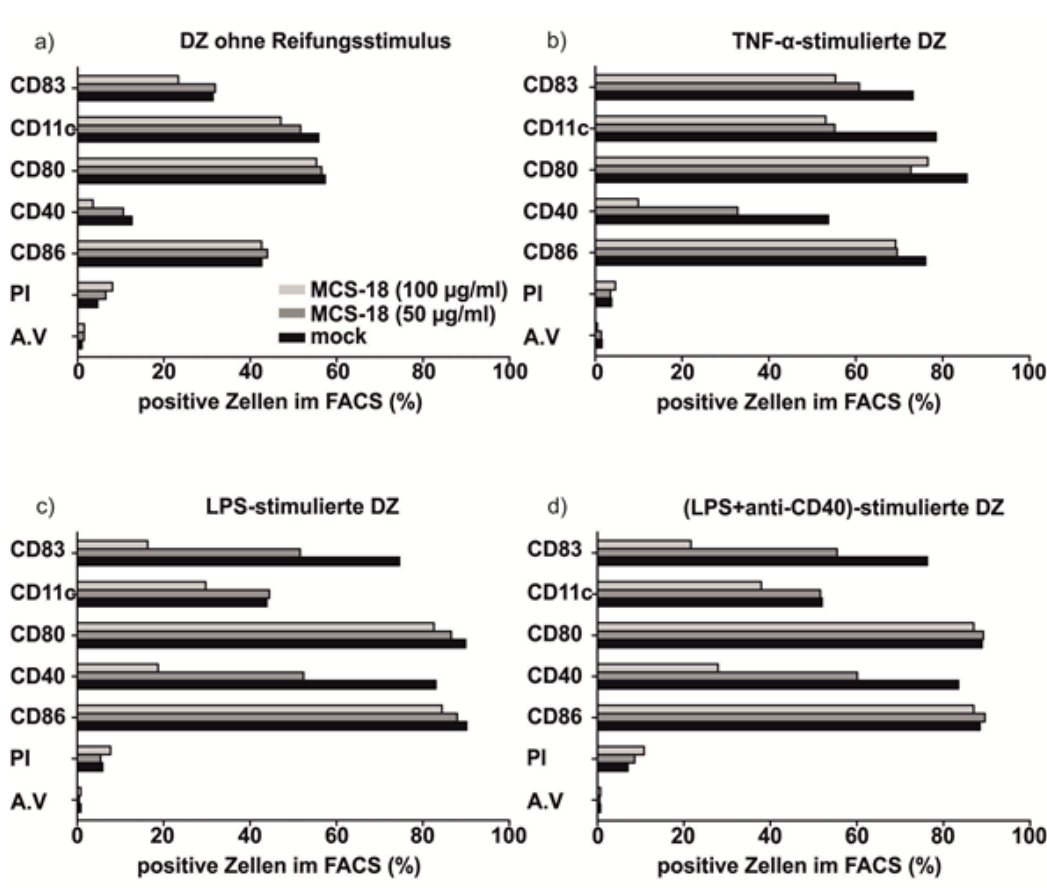
vs 100 µg/ml) nachweisen. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Bei einer Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  lag die CD83 Expression bei  $61,8 \pm 10,2\%$  (mock) und  $51,5 \pm 20,8\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $48,4 \pm 19,9\%$  (100 µg/ml MCS-18). Die CD83 Expression bei der Stimulation der Zellen mit LPS lag bei  $41,7 \pm 31,2\%$  (mock) und  $27,1 \pm 23,8\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $20,0 \pm 8,7\%$  (100 µg/ml MCS-18). Der Unterschied in der CD83 Expression (mock vs 50 µg/ml MCS-18 und mock vs 100 µg/ml) bei TNF- $\alpha$  bzw. LPS stimulierten Zellen war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Bei einer Stimulation der DZ mit LPS+anti-CD40 konnte eine signifikante Abnahme in der Expression von CD83 aufgrund der MCS-18 Behandlung festgestellt werden. Die Expression von CD83 lag bei  $47,4 \pm 30,8\%$  (mock) und  $28,5 \pm 25,3\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $18,6 \pm 10,1\%$  bei einer Inkubation mit 100 µg/ml MCS-18 (mock vs 50 µg/ml MCS-18  $p < 0,05$  und mock vs 100 µg/ml  $p < 0,05$ ).

Die Expression von CD11c lag bei unstimulierten DZ bei  $37,2 \pm 13,4\%$  (mock) und  $31,8 \pm 13,9\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $28,4 \pm 15,8\%$  (100 µg/ml MCS-18). Bei der Stimulation der DZ mit TNF- $\alpha$  konnte eine CD11c Expression von  $42,4 \pm 24,4\%$  (mock) und  $33,2 \pm 15,8\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $27,8 \pm 19,2\%$  (100 µg/ml MCS-18) festgestellt werden. Die CD11c Expression bei LPS stimulierten Zellen lag bei  $33,2 \pm 11,2\%$  (mock) und  $27,4 \pm 11,9\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $17,4 \pm 11,3\%$  (100 µg/ml MCS-18). Bei den mit LPS+anti-CD40 stimulierten DZ konnte eine CD11c Expression von  $35,9 \pm 15,1\%$  (mock) und  $30,3 \pm 14,4\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $21,4 \pm 13,8\%$  (100 µg/ml MCS-18) gemessen werden. Bei den unstimulierten Zellen sowie den mit TNF- $\alpha$ , LPS und LPS+anti-CD40 stimulierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der CD11c Expression (mock vs 50 µg/ml MCS-18 und mock vs 100 µg/ml) nachweisen.

Die CD80 Expression unstimulierter Zellen lag bei  $51,3 \pm 6,7\%$  (mock) und  $44,4 \pm 10,1\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $39,2 \pm 15,4\%$  (100 µg/ml MCS-18) und bei TNF- $\alpha$  stimulierten DZ bei  $63,5 \pm 15,3\%$  (mock) und  $54,7 \pm 13,8\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $46,9 \pm 24,0\%$  (100 µg/ml MCS-18). Die mit LPS stimulierten DZ wiesen eine CD80

## Ergebnisse

Expression von  $67,8 \pm 16,3\%$  (mock) und  $62,4 \pm 17,1\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $51,4 \pm 24,9\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) auf. Wurden die Zellen mit LPS+anti-CD40 stimuliert, lag die Expression von CD80 bei  $67,9 \pm 15,6\%$  (mock) und  $66,9 \pm 16,1\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $52,8 \pm 26,6\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Bei den unstimulierten Zellen sowie den mit TNF- $\alpha$ , LPS und LPS+anti-CD40 stimulierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der CD80 Expression (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ) nachweisen.



**Abb. 15: MCS-18 inhibiert die Expression funktionell wichtiger Oberflächenmoleküle auf murinen DZ.** Die Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Reifungsstimuli entweder in Abwesenheit (mock) oder mit 50 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 inkubiert. Im Anschluss wurden mittels FACS-Analyse DZ-spezifische Oberflächenmoleküle analysiert. CD11c, CD40, CD80, CD83 und CD86 repräsentieren Oberflächenmoleküle der DZ. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse eines Versuchs. Verwendete Abkürzungen: A.V: Annexin V, CD: cluster of differentiation, DZ: dendritische Zellen, FACS: fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, LPS: Lipopolysaccharid, PI: Propidiumiodid, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor alpha.

## Ergebnisse

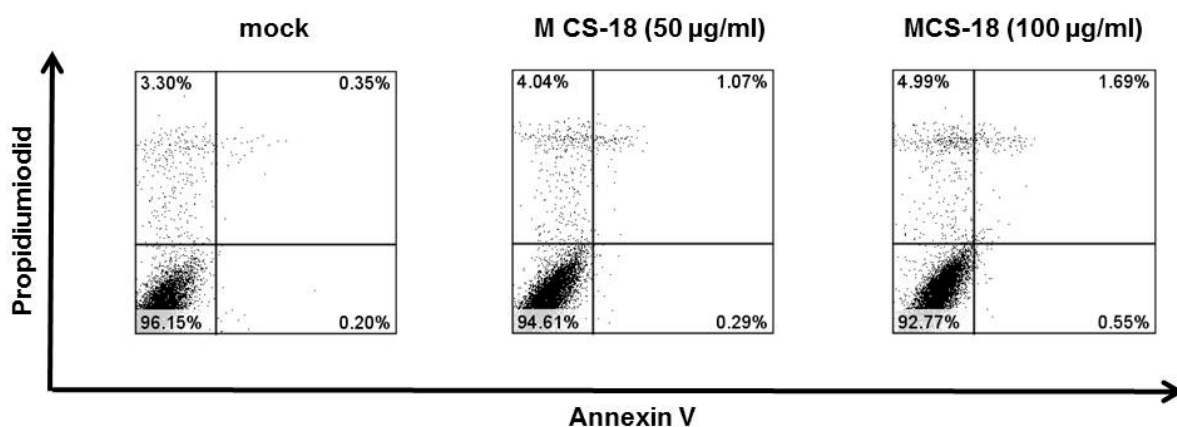
Die unstimulierten Zellen exprimierten  $16,5 \pm 10,2\%$  (mock) CD40 und  $7,8 \pm 6,0\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $4,9 \pm 2,6\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Bei TNF- $\alpha$  stimulierten DZ lag die CD40 Expression bei  $40,0 \pm 15,3\%$  (mock) und  $17,9 \pm 14,5\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $6,3 \pm 3,5\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Der Unterschied in der CD40 Expression war bei den unstimulierten Zellen sowie den mit TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen nicht signifikant (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p > 0,05$ ). Bei einer Stimulation der DZ mit LPS sowie LPS+anti-CD40 konnte eine signifikante Abnahme in der Expression von CD40 aufgrund der MCS-18 Behandlung festgestellt werden. LPS stimulierten DZ wiesen eine CD40 Expression von  $66,4 \pm 14,7\%$  (mock) und  $32,9 \pm 18,2\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $12,5 \pm 5,4\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) auf (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18  $p < 0,05$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$   $p < 0,05$ ). Bei einer Stimulation der Zellen mit LPS+anti-CD40 konnte eine Reduktion der CD40 Expression von  $67,0 \pm 15,5\%$  bei den unbehandelten Zellen (mock) auf  $36,8 \pm 21,7\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bis auf  $16,8 \pm 9,9\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) festgestellt werden (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18  $p < 0,05$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$   $p < 0,05$ ).

Unstimulierte unbehandelte DZ (mock) exprimierten  $50,5 \pm 8,2\%$  CD86 und  $44,3 \pm 5,5\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $40,9 \pm 1,5\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Unbehandelte TNF- $\alpha$  stimulierte Zellen wiesen eine Expression von  $67,7 \pm 7,7\%$  (mock) auf. Bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 lag die CD86 Expression der Zellen bei  $59,1 \pm 10,3\%$  und bei einer Inkubation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 lag sie bei  $57,1 \pm 11,6\%$ . LPS stimulierte unbehandelte DZ (mock) exprimierten  $76,0 \pm 12,4\%$  CD86. Die CD86 Expression lag bei  $69,9 \pm 15,8\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $62,5 \pm 19,0\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Bei LPS+anti-CD40 stimulierten DZ konnte eine CD86 Expression von  $76,8 \pm 10,5\%$  (mock) und  $71,9 \pm 15,6\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) bzw.  $65,3 \pm 19,1\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) gemessen werden. Bei den unstimulierten Zellen sowie den mit TNF- $\alpha$ , LPS und LPS+anti-CD40 stimulierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der CD86 Expression (mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ) nachweisen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch die verschiedenen Stimuli (TNF- $\alpha$ , LPS, LPS+anti-CD40), im Vergleich zu DZ ohne

## Ergebnisse

Reifungsstimulus, zu einer Reifung der DZ und einer damit verbundenen erhöhten Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD83, CD80 und CD86 kam. Die Behandlung der DZ mit MCS-18 führte zu einer konzentrationsabhängigen Herabregulierung der Oberflächenmoleküle CD40 und CD83. Die größte herabregulierende Wirkung von MCS-18 auf die Oberflächenmoleküle CD40 und CD83 konnte bei den durch LPS bzw. LPS+anti-CD40 stimulierten DZ beobachtet werden. DZ ohne Reifungsstimulus wiesen in Bezug auf CD40 eine MCS-18 konzentrationsabhängige Reduktion auf.

Um toxische Effekte von MCS-18 auf die murinen DZ auszuschließen, wurde eine Annexin V- und Propidiumiodid Färbung (s. Kap. 2.3.6.4) durchgeführt (Abb. 15 und 16).



**Abb. 16: MCS-18 wirkt nicht zytotoxisch auf murine DZ.** Die Zellen wurden ohne bzw. mit 50 und 100 µg/ml MCS-18 für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Annexin V- und Propidiumiodid Färbung durchgeführt. Die Abbildung zeigt exemplarisch FACS Daten von MCS-18 behandelten DZ. Bei den unbehandelten Zellen (mock) waren 3,30% positiv für Propidiumiodid (PI) und 0,35% doppelpositiv für Propidiumiodid und Annexin V. Durch die Inkubation der Zellen mit 50 bzw. 100 µg/ml MCS-18 waren 4,04% bzw. 4,99% positiv für PI und 1,07% bzw. 1,69% doppelpositiv für PI und Annexin V. Die Inkubation der Zellen mit MCS-18 induzierte somit keine Apoptose bzw. Nekrose.

Durch die Behandlung der Zellen mit MCS-18 konnte keine signifikante Erhöhung der Anzahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen festgestellt werden. Die beobachtete Reduktion der Oberflächenexpression von Markerproteinen wie CD83, CD11c,

## Ergebnisse

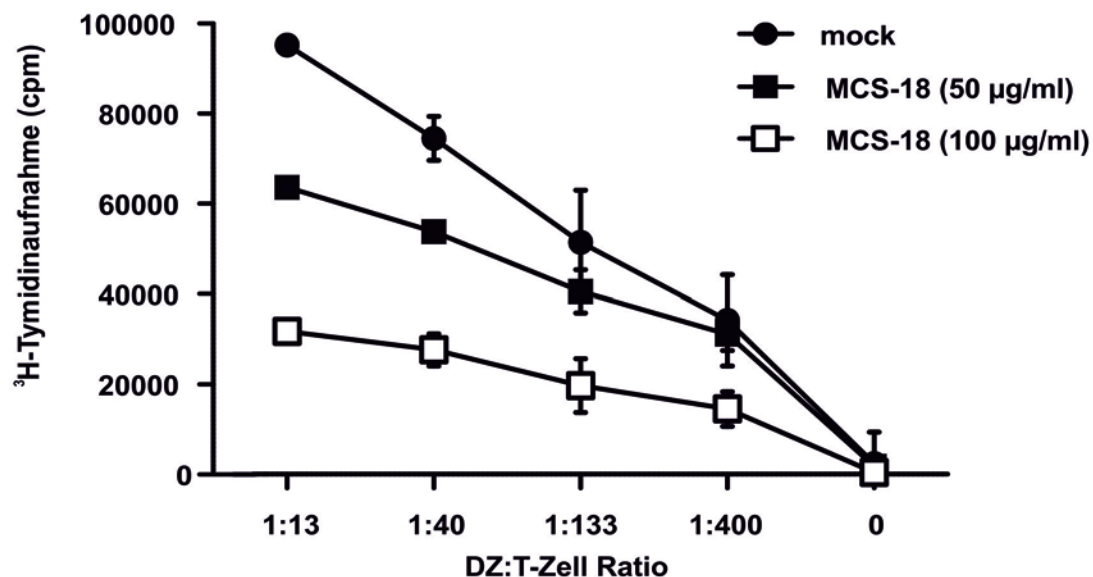
CD80, CD40 oder CD86 auf MCS-18 behandelten DZ war daher nicht auf toxische Effekte zurückzuführen.

### **3.1.2 MCS-18 behandelte, TNF- $\alpha$ stimulierte C57BL/6-DZ hemmen konzentrationsabhängig die T-Zell-Proliferation**

Die Funktionalität der mit MCS-18 behandelten DZ von C57BL/6-Mäusen wurde in einer gemischten Leukozyten-Reaktion (MLR) untersucht. Die unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an MCS-18 (50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) mit TNF- $\alpha$  stimulierten DZ wurden dabei zur Stimulation von allogeenen T-Zellen in einer MLR eingesetzt (s. Kap. 2.3.6.5). Die Zellen wurden als Triplikate in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Mit Hilfe des T-Zell-Proliferationstests durch  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau konnte die T-Zell-Proliferation gemessen werden. Die gemittelten Werte (MW) der Triplikate und die Standardabweichung (SD) eines Versuchs sind in Abb. 17 dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Versuchen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) genannt. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 0 konnten folgende Werte ermittelt werden: 1045  $\pm$  998 cpm für die unbehandelten Zellen (mock) bzw. 789  $\pm$  752 cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) und 467  $\pm$  69 cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ). Die gemessenen Werte der T-Zell-Proliferation bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:13 lagen bei 83156  $\pm$  5824 cpm (mock), 64328  $\pm$  13321 cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) und 39928  $\pm$  9903 cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p < 0,05$ ) und bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:40 bei 59901  $\pm$  8063 cpm (mock), 43188  $\pm$  5865 cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p < 0,05$ ) und 31248  $\pm$  5143 cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ). Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:133 konnten Werte von 42006  $\pm$  6182 cpm für die unbehandelten Zellen (mock) und 34151  $\pm$  2942 cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) bzw. 15723  $\pm$  5323 cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs

## Ergebnisse

100 µg/ml MCS-18:  $p < 0,05$ ) gemessen werden. Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:400 wurde  $21382 \pm 9068$  cpm (mock) bzw.  $19398 \pm 8075$  cpm (50 µg/ml MCS-18; mock vs 50 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ) und  $7292 \pm 5323$  cpm (100 µg/ml MCS-18; mock vs 100 µg/ml MCS-18:  $p < 0,05$ ) ermittelt.



**Abb. 17: MCS-18 behandelte, durch TNF- $\alpha$  stimulierte DZ von C57BL/6-Mäusen zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der allogenen T-Zell-Proliferation.** Im MLR-Assay wurden MCS-18 behandelte bzw. unbehandelte murine C57BL/6-DZ in titrierter Anzahl (30000, 10000, 3000, 1000, 0) als Triplikate für 72 Stunden mit jeweils  $4 \times 10^5$  T-Zellen einer BALB/C Maus inkubiert, woraus sich die angegebenen DZ:T-Zellverhältnisse errechneten. Durch den <sup>3</sup>H-Thymidineinbau in den darauffolgenden 16 Stunden konnte anschließend die Proliferation gemessen werden. Die mit MCS-18 behandelten DZ zeigen im Vergleich zu unbehandelten DZ eine konzentrationsabhängige Hemmung der T-Zell-Proliferation. Die gezeigten Daten stellen exemplarisch ein Experiment dar. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der arithmetischen Mittelwerte (MW) der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Verwendete Abkürzungen: cpm: Zahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute), DZ: dendritische Zellen

Dieser Versuch hat gezeigt, dass unbehandelte mit TNF- $\alpha$  stimulierte DZ (mock) eine ausgeprägte stimulatorische Fähigkeit aufweisen, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:40 wiesen die mit 50 µg/ml MCS-18 behandelten DZ eine signifikante Reduktion in der T-Zell-Proliferation auf. Dieser



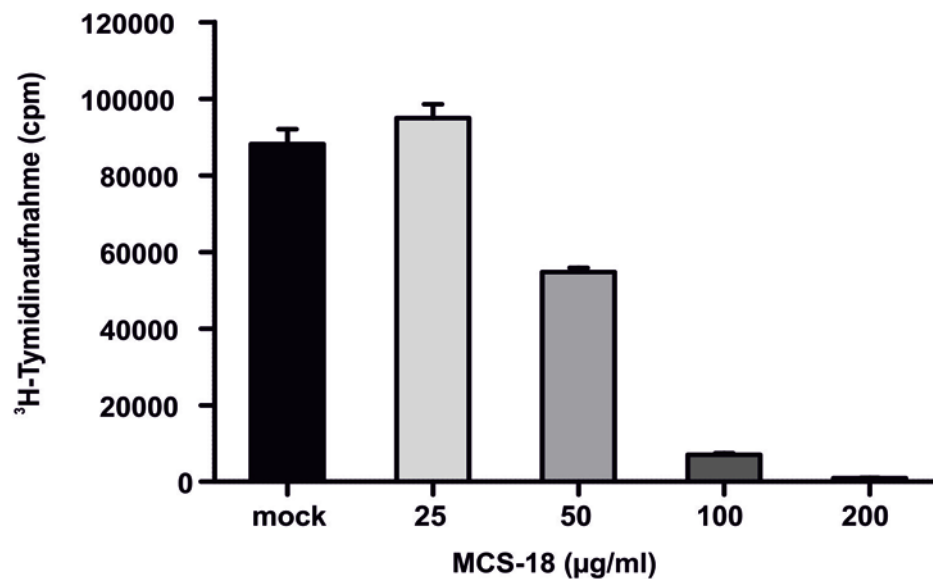
## Ergebnisse

Effekt zeigte sich bei 100 µg/ml MCS-18 noch verstärkt (Abb. 17). Durch diese mit 100 µg/ml MCS-18 inkubierten DZ wurde eine signifikante Abnahme in der T-Zell-Proliferation bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:13, 1:133 sowie 1:400 hervorgerufen.

### **3.2 MCS-18 behandelte, LPS stimulierte B-Zellen zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCS-18 die Expression DZ-spezifischer Oberflächenmoleküle inhibiert (Abb. 15). Inwieweit MCS-18 auch die Proliferation von B-Zellen zu beeinflussen vermochte, konnte bisher nicht geklärt werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde bei dem folgenden Experiment die Wirkung von MCS-18 auf die B-Zell-Proliferation genauer untersucht. Die B-Zellen ( $10^5$  Zellen/ml) wurden dabei für 3 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen (25, 50, 100, 200 µg/ml) an MCS-18 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden mit LPS stimuliert. Die Zellen wurden als Triplikate in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert, und durch die Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin für weitere 16 Stunden konnte anschließend die Proliferationsrate der B-Zellen gemessen werden. Das in Abb. 18 dargestellte Säulendiagramm repräsentiert das Ergebnis eines Einzelversuchs. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Versuchen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) genannt. Zur Kontrolle (mock) dienten Zellen, die unbehandelt waren und nur mit LPS stimuliert wurden. Für diese unbehandelten Zellen ergab sich ein Wert von  $109309 \pm 26286$  cpm. Die B-Zell-Proliferationsrate lag für 25 µg/ml MCS-18 bei  $102115 \pm 15309$  cpm (mock vs 25 µg/ml MCS-18,  $p > 0,05$ ), für 50 µg/ml MCS-18 bei  $71360 \pm 15209$  cpm (mock vs 50 µg/ml MCS-18,  $p < 0,05$ ), für 100 µg/ml MCS-18 bei  $7396 \pm 6938$  cpm (mock vs 100 µg/ml MCS-18,  $p < 0,05$ ) und für 200 µg/ml MCS-18 bei  $1821 \pm 1008$  cpm (mock vs 200 µg/ml MCS-18,  $p < 0,05$ ). Dieser Versuch hat gezeigt, dass durch die Behandlung der B-Zellen mit MCS-18 eine signifikante Reduktion der B-Zell-Proliferation hervorgerufen wird. Diese Abnahme wurde ab einer Konzentration von 50 µg/ml MCS-18 im Vergleich zu unbehandelten B-Zellen festgestellt (Abb. 18).

## Ergebnisse



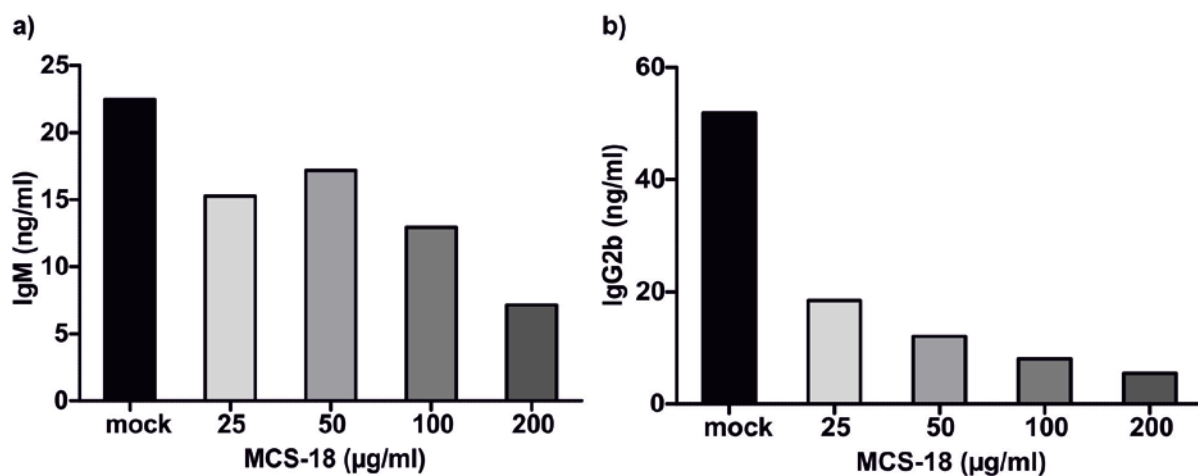
**Abb. 18: Mit MCS-18 behandelte, LPS stimulierte B-Zellen zeigen eine Hemmung in der Proliferation.** Ab einer Konzentration von 50 µg/ml MCS-18 zeigte sich eine reduzierte Proliferation der behandelten B-Zellen im Vergleich zu unbehandelten B-Zellen (mock). Die gezeigten Daten stellen exemplarisch ein Experiment dar. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der Mittelwerte (MW), aus den Triplikaten und die Standardabweichung (SD). Diese wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Verwendete Abkürzung: cpm: Zahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute).

### 3.2.1 MCS-18 hemmt konzentrationsabhängig die Immunglobulin-Sekretion von LPS-stimulierten B-Zellen

Inwiefern MCS-18 neben der Proliferation der B-Zellen auch deren Immunglobulin-Produktion zu beeinflussen vermochte, war bis *dato* nicht geklärt. Hierzu wurde der Überstand der mit MCS-18 behandelten bzw. unbehandelten, LPS-stimulierten B-Zellen gewonnen und mittels ELISA die Immunglobulin-Konzentration bestimmt (s Kap. 2.3.6.6). In Abb. 19 ist der aus Duplikaten gemittelte Wert eines Versuchs dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Versuchen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) genannt. Bei unbehandelten Zellen (mock) konnte eine IgM-Sekretion von  $30,5 \pm 13,9$  ng/ml festgestellt werden. Für die mit MCS-18 behandelten Zellen wurden folgende Werte ermittelt:  $30,1 \pm 13,2$  ng/ml (25 µg/ml MCS-18),  $23,6 \pm 7,2$  ng/ml (50 µg/ml MCS-18),  $19,9 \pm 7,4$

## Ergebnisse

ng/ml (100 µg/ml MCS-18),  $13,6 \pm 5,7$  ng/ml (200 µg/ml MCS-18). Der Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen (mock) und den mit 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml MCS-18 behandelten Zellen war nicht signifikant. Zwischen den unbehandelten Zellen (mock) und den mit 100 µg/ml bzw. 200 µg/ml MCS-18 behandelten Zellen konnte eine signifikante Reduktion in der IgM-Sekretion (mock vs 100 µg/ml MCS-18  $p < 0,05$  und mock vs 200 µg/ml MCS-18  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet.



**Abb. 19: MCS-18 reduziert konzentrationsabhängig die Immunglobulin-Sekretion LPS-stimulierter B-Zellen.** LPS-stimulierte B-Zellen wurden für 3 Tage mit 25, 50, 100 oder 200 µg/ml MCS-18 inkubiert. Als Kontrolle (mock) dienten unbehandelte, LPS-stimulierte B-Zellen. Mit Hilfe eines ELISAs wurde die IgM-(a) bzw. IgG2b-Konzentration (b) im Überstand bestimmt. Die IgM- bzw. IgG2b-Sekretion nahm im Vergleich zu unbehandelten Zellen konzentrationsabhängig ab. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der Mittelwerte (MW) von Doppelbestimmungen.

Die ermittelte IgG2b-Sekretion lag bei  $45,6 \pm 5,9$  ng/ml (mock),  $28,7 \pm 9,7$  ng/ml (25 µg/ml MCS-18),  $20,4 \pm 13,8$  ng/ml (50 µg/ml MCS-18),  $14,2 \pm 14,6$  ng/ml (100 µg/ml MCS-18)  $12,5 \pm 16,5$  ng/ml (200 µg/ml MCS-18). Der Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen (mock) und den mit 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml MCS-18 behandelten Zellen war nicht signifikant. Zwischen den unbehandelten Zellen (mock) und den mit 100 µg/ml bzw. 200 µg/ml MCS-18 behandelten Zellen konnte eine signifikante Reduktion in der IgM-Sekretion (mock vs 100 µg/ml MCS-18  $p < 0,05$

## Ergebnisse

und mock vs 200 µg/ml MCS-18  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet.

### **3.2.2 MCS-18 inhibiert die durch Zytokine hervorgerufene Produktion der Immunglobuline IgG1, IgG2a und IgG2b durch B-Zellen**

Ruhende B-Zellen durchlaufen mehrere Entwicklungsstadien, bis sie zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle heranreifen. Nach dem Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen und dem durch T-Zellen in Form von Zytokinen freigesetztem Aktivierungssignal werden die B-Zellen zur Proliferation angeregt. LPS Gram-negativer Bakterien repräsentiert ein B-Zell aktivierendes Agens, durch welches diese zu antikörperproduzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren (Andersson *et al.*, 1972). Durch die Zugabe von LPS kann in Plasmazellen die Produktion von IgG2b ausgelöst werden (Lettessjo *et al.*, 1997). Des Weiteren synthetisieren murine B-Zellen *in vitro* IgG1 nach Stimulation durch LPS und IL-4/IL-5 (s. Kap. 2.2.7.1). Die Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  ruft eine Synthese von IgG2a hervor (DeKruyff *et al.*, 1990). IFN- $\gamma$  repräsentiert ein primär von Th1-Zellen exprimiertes Zytokin. Die Interleukine IL-4 und IL-5 werden von Th2-Zellen produziert.

Inwieweit MCS-18 Einfluss auf die durch unterschiedliche Signale ausgelöste, Antikörperproduktion hat, wurde mit folgendem Versuch genauer untersucht. Die durch die MACS-Separation gewonnenen CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden für drei Tage mit LPS, mit LPS und IFN- $\gamma$ , bzw. mit LPS, IL-4 und IL-5 stimuliert. Diese Stimulation erfolgte in An- bzw. Abwesenheit steigender MCS-18 Konzentrationen (25, 50, 100 µg/ml). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern spezifisch für die Immunglobulin-Subklassen IgG1, IgG2a, IgG2b markiert und mittels FACS-Analyse die Expression dieser Immunglobuline bestimmt. In Abb. 20 sind die Ergebnisse eines Versuchs dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus drei Experimenten aufgeführt. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet.

## Ergebnisse

Unstimulierte und unbehandelte Kontrollzellen wiesen in Abwesenheit von MCS-18 eine IgG1-spezifische Expressionsrate von  $6,46 \pm 0,34\%$  auf. Die mit MCS-18 behandelten, unstimulierten Zellen exprimierten zu  $4,70 \pm 1,97\%$  IgG1 (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $5,52 \pm 3,94\%$  IgG1 (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $6,85 \pm 4,5\%$  IgG1 (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Von den unbehandelten, mit LPS stimulierten Zellen exprimierten  $10,06 \pm 1,83\%$  IgG1. Bei den mit MCS-18 behandelten und mit LPS stimulierten Zellen konnten folgende Werte ermittelt werden:  $12,98 \pm 1,97\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $11,63 \pm 3,89\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $9,06 \pm 2,62\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). LPS/IFN- $\gamma$  stimulierte Zellen wiesen eine IgG1 Expression von:  $13,73 \pm 3,87\%$  (mock),  $14,26 \pm 0,33\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $10,10 \pm 1,11\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $9,36 \pm 4,46\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) auf. Bei den unstimulierten Zellen sowie den mit LPS bzw. LPS und IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der IgG1 Expression (mock vs 25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18, mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p > 0,05$ ) nachweisen. Die Expression von IgG1 der mit LPS/IL-4/IL-5 stimulierten Zellen lag bei:  $21,20 \pm 2,81\%$  (mock),  $16,12 \pm 3,00\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $14,77 \pm 3,58\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $9,32 \pm 4,88\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Bei dieser Stimulation konnte kein signifikanter Unterschied in der IgG1 Expression für mock vs 25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 ( $p > 0,05$ ) nachgewiesen werden. Eine signifikante Abnahme in der IgG1 Expression konnte für mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ).

Die IgG2a Expression bei unstimulierten, unbehandelten Zellen lag bei  $2,97 \pm 2,01\%$ . Die mit MCS-18 behandelten, unstimulierten Zellen exprimierten  $2,47 \pm 1,42\%$  IgG2a (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $2,13 \pm 1,39\%$  IgG2a (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $2,59 \pm 2,40\%$  IgG2a (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Unbehandelte mit LPS stimulierte Zellen exprimierten  $12,64 \pm 5,60\%$  IgG2a. Bei den mit MCS-18 behandelten und LPS stimulierten Zellen konnten folgende Werte für die IgG2 Expression ermittelt werden:  $9,78 \pm 3,69\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $7,69 \pm 3,39\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $4,33 \pm 2,16\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). LPS/IL-4/IL-5 stimulierte Zellen exprimierten  $5,54 \pm 1,03\%$  (mock),  $6,37 \pm 1,89\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $4,42 \pm 1,02\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und

## Ergebnisse

$3,77 \pm 2,74\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) IgG2a. Die Expression von IgG2a lag bei den mit LPS/IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen bei:  $26,22 \pm 20,86\%$  (mock),  $19,53 \pm 10,36\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $11,15 \pm 5,83\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $4,35 \pm 1,19\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Bei den unstimulierten Zellen sowie den mit LPS, LPS und IFN- $\gamma$  und LPS/IL-4/IL-5 stimulierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der IgG2a Expression (mock vs 25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18, mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p > 0,05$ ) nachweisen.

Die IgG2b Expression bei unstimulierten, unbehandelten Zellen lag bei  $1,58 \pm 1,27\%$ . Die mit MCS-18 behandelten, unstimulierten Zellen exprimierten  $0,86 \pm 0,27\%$  IgG2b (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $0,69 \pm 0,46\%$  IgG2b (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $0,79 \pm 0,93\%$  IgG2b (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). LPS/IL-4/IL-5 stimulierte Zellen exprimierten  $5,31 \pm 0,69\%$  (mock),  $2,32 \pm 2,30\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $1,85 \pm 1,72\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $0,99 \pm 0,51\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) IgG2b. Die IgG2b Expression der LPS/IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen lag bei:  $3,24 \pm 1,03\%$  (mock),  $2,09 \pm 0,98\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $1,49 \pm 1,32\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $0,90 \pm 0,61\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Unbehandelte mit LPS stimulierte Zellen exprimierten  $7,69 \pm 1,63\%$  IgG2b. Die unstimulierten Zellen sowie die mit LPS und IFN- $\gamma$  bzw. LPS/IL-4/IL-5 stimulierten Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied in der IgG2b Expression (mock vs 25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18, mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p > 0,05$ ) auf. Bei den mit MCS-18 behandelten und LPS stimulierten Zellen konnten folgende Werte in Bezug auf die IgG2b Expression ermittelt werden:  $2,97 \pm 1,31\%$  (25  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18),  $1,80 \pm 0,74\%$  (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18) und  $1,19 \pm 0,69\%$  (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18). Eine signifikante Abnahme in der IgG2b Expression konnte für mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  und mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ).

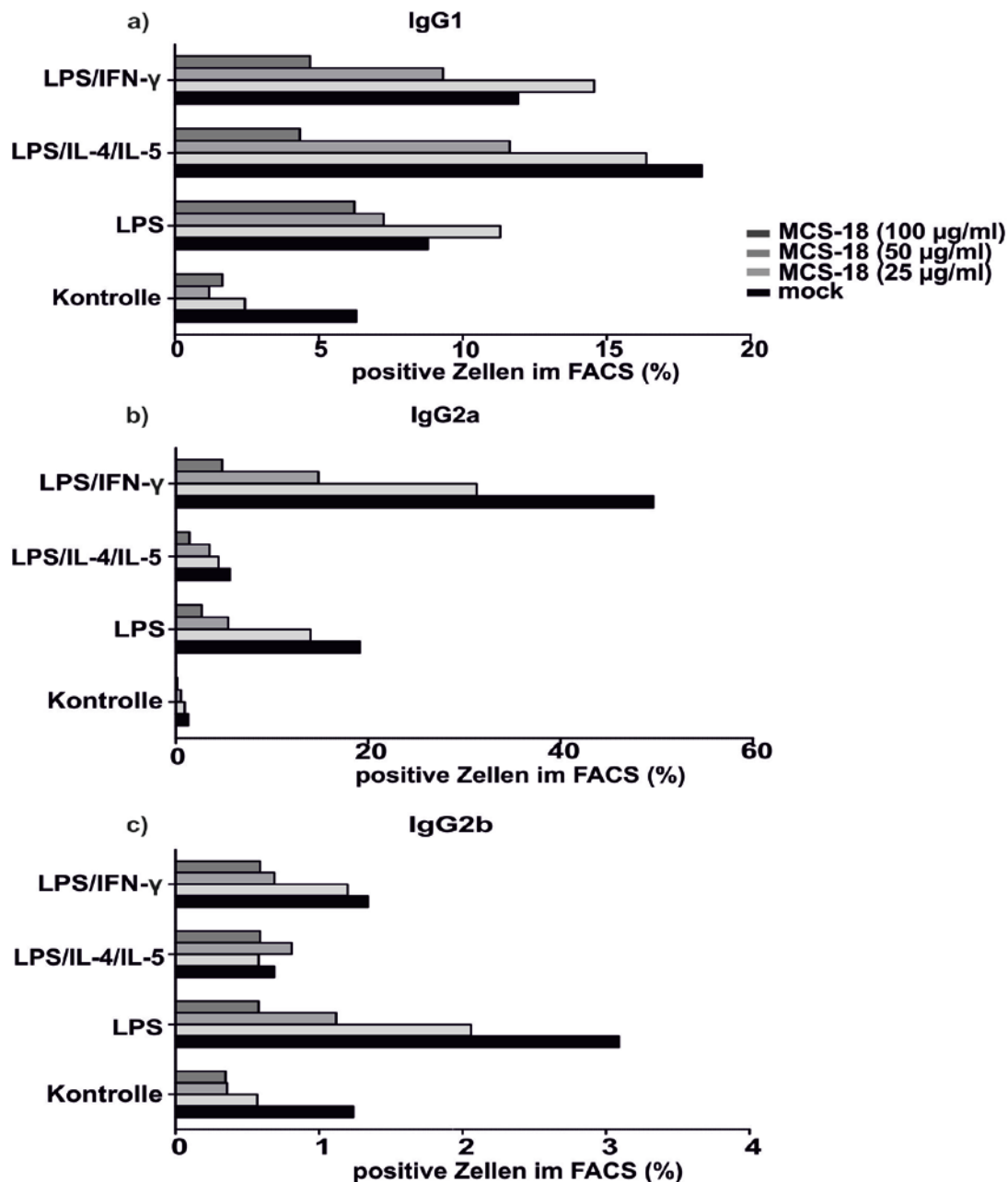
Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass hinsichtlich der IgG1 Expression, die MCS-18 Behandlung weder bei den unstimulierten Kontrollzellen noch bei den mit LPS oder LPS und IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen zu einer Veränderung der IgG1 Expression geführt hat. Die durch die Stimulation der Zellen mit LPS/IL-4/IL-5 hervorgerufene Synthese von IgG1 (Abb. 20a) konnte durch MCS-18

## Ergebnisse

konzentrationsabhängig reduziert werden (mock vs 50 µg/ml und mock vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ). Hinsichtlich der IgG2a Expression hat die MCS-18 Behandlung weder bei den unstimulierten Kontrollzellen noch bei den mit LPS, LPS und IFN- $\gamma$  bzw. LPS/IL-4/IL-5 stimulierten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der IgG2a Expression geführt (Abb. 20b). Die Expressionsraten für IgG2b waren allgemein sehr niedrig (Abb. 20c). Durch die MCS-18 Behandlung konnte keine signifikante Reduktion der IgG2b Expression bei den unstimulierten sowie den mit LPS und IFN- $\gamma$  bzw. LPS/IL-4/IL-5 stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Die IgG2b-spezifischen Expressionsraten nach Aktivierung der murinen B-Zellen durch LPS alleine wiesen eine dosisabhängige Reduktion aufgrund der MCS-18 Behandlung (mock vs 50 µg/ml und mock vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ) auf.

Zusammenfassend lässt sich nach den *in vitro* Ergebnisse sagen, dass MCS-18 inhibitorisch auf murine DZ sowie B-Zellen wirkt. Durch MCS-18 wurden die Oberflächenmoleküle CD40 und CD83 der behandelten DZ herunterreguliert. Zudem wiesen diese DZ eine verminderte Fähigkeit allogene T-Zellen zu stimulieren auf. Die B-Zell-Proliferation sowie die IgG-Sekretion konnte durch MCS-18 ebenfalls reduziert werden.

## Ergebnisse



**Abb. 20: MCS-18 reduziert konzentrationsabhängig die IgG-Expression stimulierter B-Zellen.** Murine B-Zellen wurden für drei Tage mit LPS, LPS/IFN- $\gamma$  und LPS/IL-4/IL-5 stimuliert. Während der Stimulation wurden die Zellen mit 0 (mock), 25, 50 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18 inkubiert. Mittels FACS-Analyse wurde die Expression der Immunglobulin-Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b gemessen. Die durch die unterschiedliche Stimulation der B-Zellen hervorgerufene Expression verschiedener Immunglobulin-Subklassen konnte mit steigender Konzentration an MCS-18 reduziert werden. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments. Verwendete Abkürzungen: FACS: fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, IFN- $\gamma$ : Interferon gamma, IgG: Immunglobulin G, IL: Interleukin, LPS: Lipopolysaccharid.



### 3.3 Einfluss von MCS-18 auf murine DZ von NOD-Mäusen

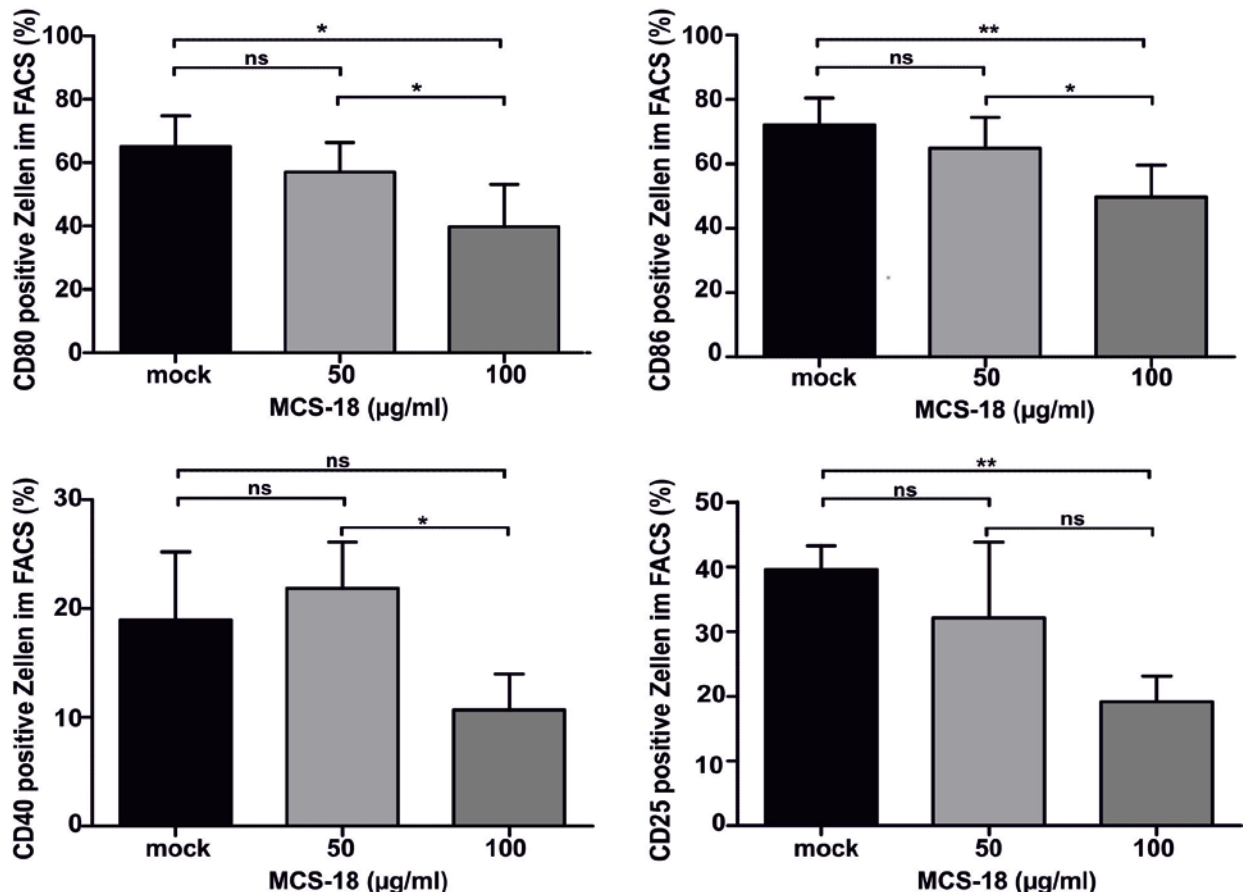
In dieser Arbeit wurde MCS-18 im non-obese diabetic (NOD) Mausmodell eingesetzt (s. Kap. 3.4). Die Verwendung dieses Mausmodells ist dadurch begründet, dass es das am häufigsten verwendete und aussagekräftigste Tiermodell zur Erforschung des humanen *Diabetes mellitus* Typ1 (T1D) darstellt. Durch die vorangegangenen Experimente konnte ein inhibitorisches Potential von MCS-18 auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, wie CD40 und CD83, auf murinen DZ von C57/BL6-Mäusen festgestellt werden (s. Kap. 3.1.1). Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, inwieweit MCS-18 auch einen Einfluss auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle auf murine DZ von NOD-Mäusen hat.

#### 3.3.1 MCS-18 inhibiert die Expression DZ-spezifischer Reifungsmarker

Um den Einfluss von MCS-18 auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker von DZ der NOD-Maus zu untersuchen, wurden die Zellen im FACS phänotypisch charakterisiert. An Tag 8 wurden die Zellen mit 50 bzw. 100 µg/ml MCS-18 für 36 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, ohne weiteres Waschen, mit LPS für 12 Stunden stimuliert und im FACS analysiert (Abb. 21). Der jeweilige Anteil immunreaktiver DZ betrug im arithmetischen Mittel für das Oberflächenmolekül CD86 (n=5) bei unbehandelten Zellen (mock)  $72 \pm 8,4\%$ , in Anwesenheit einer MCS-18 Konzentration von 50 µg/ml  $64,8 \pm 9,5\%$  und einer MCS-18 Konzentration von 100 µg/ml  $49,7 \pm 9,9\%$  (mock vs 50 µg/ml, nicht signifikant; mock vs 100 µg/ml,  $p < 0,01$ ; 50 µg/ml vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ). Die Expression von CD80 (n=5) nahm von  $65 \pm 9,6\%$  (mock) auf  $57 \pm 9,3\%$  (50 µg/ml MCS-18) ab und reduzierte sich bis auf  $39,7 \pm 13,3\%$  (100 µg/ml MCS-18) (mock vs 50 µg/ml, nicht signifikant; mock vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ; 50 µg/ml vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ). Die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 (n=4) lag bei  $39,6 \pm 3,6\%$  (mock) und  $32,12 \pm 11,7\%$  (50 µg/ml MCS-18) bzw.  $19,1 \pm 3,9\%$  (100 µg/ml MCS-18) (mock vs 50 µg/ml, nicht

## Ergebnisse

signifikant; mock vs 100 µg/ml,  $p < 0,01$ ; 50 µg/ml vs 100 µg/ml, nicht signifikant). Keinen Effekt bzw. eine leichte Erhöhung der Expression von CD40 wurde bei einer Konzentration von 50 µg/ml MCS-18 beobachtet. Hierbei wurde für mock (n=4) der Wert  $18,9 \pm 6,2\%$  und für 50 µg/ml MCS-18  $21,85 \pm 4,2\%$  ermittelt (mock vs 50 µg/ml, nicht signifikant).



**Abb. 21: MCS-18 reduziert die Expression von CD80, CD86, CD40 und CD25 in DZ der NOD-Maus.** DZ von NOD-Mäusen wurden für 36 Stunden mit 50 bzw. 100 µg/ml MCS-18 vorinkubiert und anschließend mit LPS für 12 Stunden gereift. Die FACS-Analyse zeigte, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (mock), eine reduzierte Expression von CD80, CD86, CD40 und CD25, welche Oberflächenmoleküle der DZ repräsentieren. Für die Oberflächenmarker CD80, CD86 bzw. CD40, CD25 wurden die Mittelwerte von 5 bzw. 4 unabhängigen Versuchen mit den dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Statistisch signifikante Werte sind mit  $p < 0,05$  (\*) und  $p < 0,01$  (\*\*) gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: CD: cluster of differentiation, FACS: fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, ns: nicht signifikant.

## Ergebnisse

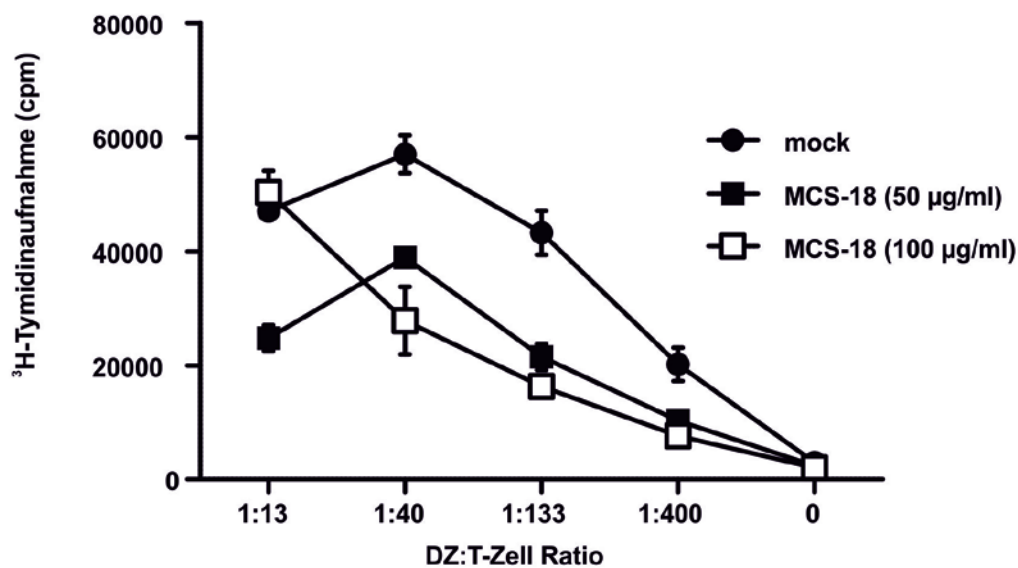
Bei der Behandlung mit 100 µg/ml MCS-18 lag die CD40 Expression bei  $10,68 \pm 3,9\%$  (mock vs 100 µg/ml, nicht signifikant; 50 µg/ml vs 100 µg/ml,  $p < 0,05$ ). Zusammenfassend kann man sagen, dass sich Expression von CD80, CD86 und CD25 durch die Inkubation mit 100 µg/ml MCS-18 reduziert wird (Abb. 21).

### **3.3.2 MCS-18 behandelte, LPS gereifte DZ von NOD-Mäusen hemmen konzentrationsabhängig die T-Zell-Proliferation**

Die Funktionalität der mit MCS-18 behandelten NOD-DZ wurde in einer gemischten Leukozyten-Reaktion (MLR) untersucht. Die in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an MCS-18 (50, 100 µg/ml) mit LPS stimulierten DZ wurden zur Stimulierung von allogeenen T-Zellen in einer MLR eingesetzt (s. Kap. 2.3.6.5). Die Zellsuspension wurden in eine 96-Loch-Flachbodenplatte als Triplikate pipettiert. Mit Hilfe des T-Zell-Proliferationstests durch  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau wurde die T-Zell-Proliferation gemessen. Die gemittelten Werte (MW) der Triplikate und die Standardabweichung (SD) eines Versuchs sind in Abb. 22 dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei Versuchen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) genannt. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 0 konnten folgende Werte ermittelt werden:  $1337 \pm 1427$  cpm für die unbehandelten Zellen (mock) bzw.  $1068 \pm 1140$  cpm (50 µg/ml MCS-18; mock vs 50 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ) und  $1024 \pm 904$  cpm (100 µg/ml MCS-18; mock vs 100 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ). Die gemessenen Werte der T-Zell-Proliferation bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:13 lagen bei  $47505 \pm 20870$  cpm (mock),  $30077 \pm 19138$  cpm (50 µg/ml MCS-18; mock vs 50 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ) und  $33887 \pm 16998$  cpm (100 µg/ml MCS-18; mock vs 100 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ). Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:40 bei  $43226 \pm 22890$  cpm (mock),  $30885 \pm 13647$  cpm (50 µg/ml MCS-18; mock vs 50 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ) und  $24015 \pm 10155$  cpm (100 µg/ml MCS-18; mock vs 100 µg/ml MCS-18:  $p > 0,05$ ). Bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:133 wurden die Werte  $28551 \pm 13616$  cpm für die

## Ergebnisse

unbehandelten Zellen (mock) und  $15910 \pm 5176$  cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) bzw.  $12235 \pm 6937$  cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) gemessen. Die Messung bei einer DZ:T-Zell Ratio von 1:400 ergab folgende Werte:  $11213 \pm 8260$  cpm (mock) bzw.  $7375 \pm 2533$  cpm (50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 50  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ) und  $5580 \pm 3239$  cpm (100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18; mock vs 100  $\mu\text{g/ml}$  MCS-18:  $p > 0,05$ ).

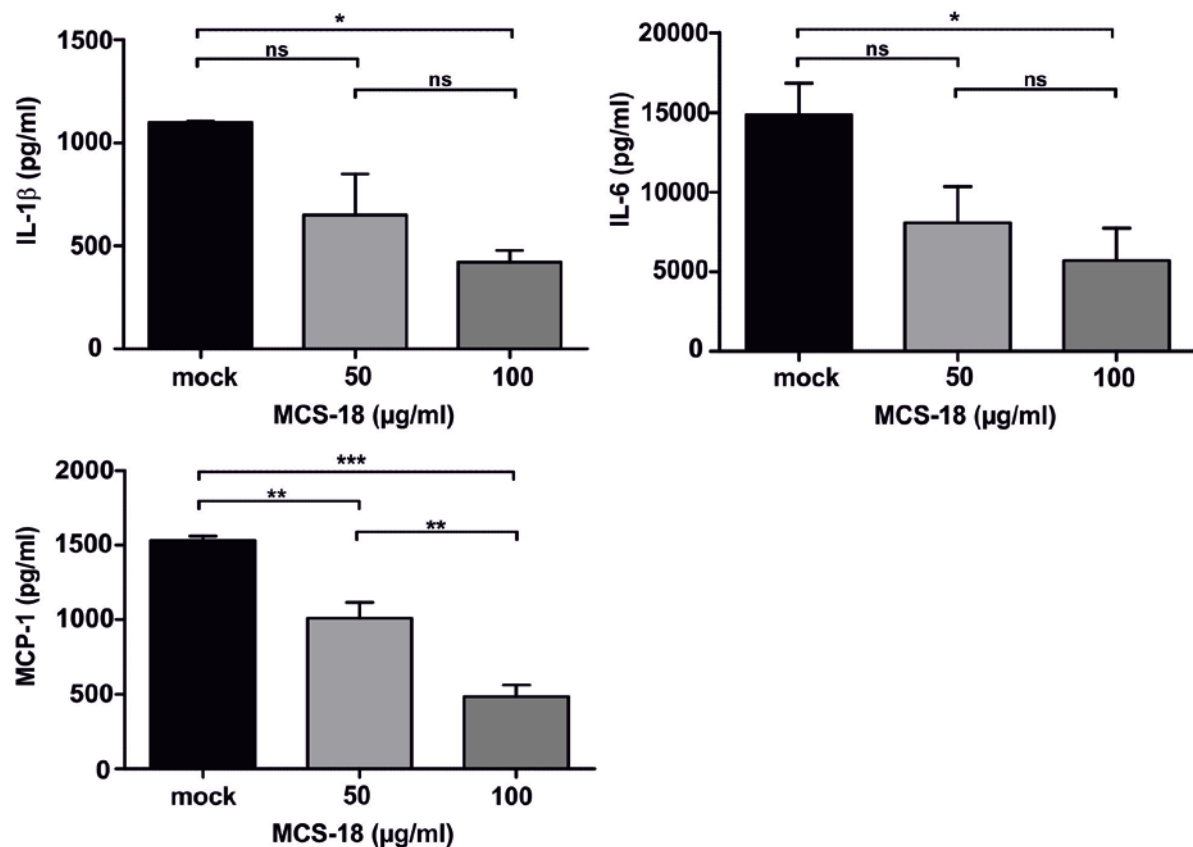


**Abb. 22: MCS-18 behandelte, durch LPS stimulierte NOD-DZ zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der allogenen T-Zell-Proliferation.** Im MLR-Assay wurden MCS-18 behandelte bzw. unbehandelte murine NOD-DZ in titrierter Anzahl (30000, 10000, 3000, 1000, 0) als Triplikate für 72 Stunden mit jeweils  $4 \times 10^5$  T-Zellen einer C57BL/6-Maus inkubiert, woraus sich die angegebenen DZ:T-Zellverhältnisse errechneten. Durch den  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in den darauffolgenden 16 Stunden konnte anschließend die Proliferation gemessen werden. Die mit MCS-18 behandelten DZ zeigen im Vergleich zu unbehandelten DZ eine konzentrationsabhängige Hemmung der T-Zell-Proliferation. Die gezeigten Daten stellen exemplarisch ein Experiment dar. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der gemittelten Werte (MW) der Triplikate  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Verwendete Abkürzungen: cpm: Zahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute), DZ: dendritische Zellen

### 3.3.3 MCS-18 vermindert die Zytokin-Sekretion in behandelten DZ

Proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-1 $\beta$  und auch das Chemokin MCP-1 spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Entzündungen sowie von Autoimmunerkrankungen (Blanco *et al.*, 2008). Um herauszufinden, ob MCS-18 die Expression dieser proinflammatorischen Zytokine in DZ der NOD-Maus zu inhibieren vermochte, wurden die an Tag 8 gewonnenen DZ für 36 Stunden mit MCS-18 inkubiert und für weitere 12 Stunden mit LPS stimuliert. Unbehandelte, mit LPS stimulierte DZ dienten als Kontrollzellen (mock). Um den Einfluss von MCS-18 auf die Zytokin-Expression zu untersuchen, wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration von IL-6 und MCP-1 mit Hilfe eines CytometricBead Arrays (CBA) und die von IL-1 $\beta$  mittels ELISA bestimmt. Die gemittelten Werte und deren Standardabweichung aus 3 CBAs waren für IL-6:  $14852 \pm 1985$  pg/ml (mock),  $8072 \pm 2262$  pg/ml (50  $\mu$ g/ml MCS-18) und  $5715 \pm 20310$  pg/ml (100  $\mu$ g/ml MCS-18) (mock vs 50  $\mu$ g/ml MCS-18, nicht signifikant; mock vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18,  $p < 0,05$ ; 50  $\mu$ g/ml MCS-18 vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18, nicht signifikant) und für MCP-1:  $1533 \pm 28$  pg/ml (mock),  $1010 \pm 105$  pg/ml (50  $\mu$ g/ml MCS-18) und  $484 \pm 78$  pg/ml (100  $\mu$ g/ml MCS-18) (mock vs 50  $\mu$ g/ml MCS-18,  $p < 0,01$ ; mock vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18,  $p < 0,001$ ; 50  $\mu$ g/ml MCS-18 vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18,  $p < 0,01$ ). Durch den IL-1 $\beta$  ELISA wurden folgende Werte ermittelt:  $1099 \pm 6$  pg/ml (mock),  $649 \pm 200$  pg/ml (50  $\mu$ g/ml MCS-18),  $420 \pm 57$  pg/ml (100  $\mu$ g/ml MCS-18) (mock vs 50  $\mu$ g/ml MCS-18, nicht signifikant; mock vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18,  $p < 0,05$ ; 50  $\mu$ g/ml MCS-18 vs 100  $\mu$ g/ml MCS-18, nicht signifikant). Die Inkubation der DZ mit MCS-18 führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Sekretion von MCP-1 sowie der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 (100  $\mu$ g/ml MCS-18) (Abb. 23). MCS-18 wirkte sich bei MCP-1 schon ab einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml inhibierend auf die Sekretion aus. Die Abnahme der Sekretion war bei 100  $\mu$ g/ml MCS-18 noch deutlicher ausgeprägt.

## Ergebnisse



**Abb. 23: Inkubation der DZ mit MCS-18 bewirkt eine verminderte Sekretion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und des Chemokins MCP-1.** Die Kulturüberstände der mit MCS-18 behandelten bzw. unbehandelten Zellen (mock) wurden abgenommen und mittels CBA bzw. ELISA auf ihren Zytokin bzw. Chemokin-Gehalt untersucht. MCS-18 reduziert die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL1 $\beta$  und des Chemokins MCP-1. Dargestellt wurden die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Statistisch signifikante Werte sind mit  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 beta, MCP-1: Monozyten-Chemoattraktor-Protein-, ns: nicht signifikant.

### 3.4 MCS-18 im NOD-Mausmodell

Um mögliche therapeutische Anwendungen von MCS-18 beim *Diabetes mellitus* Typ1 (T1D) zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit MCS-18 im NOD-Mausmodell *in vivo* eingesetzt. Es sollte geklärt werden, inwieweit MCS-18 Einfluss auf die T1D-Pathogenese hat. Das *in vivo* Experiment (s. Kap. 3.4.1) wurde

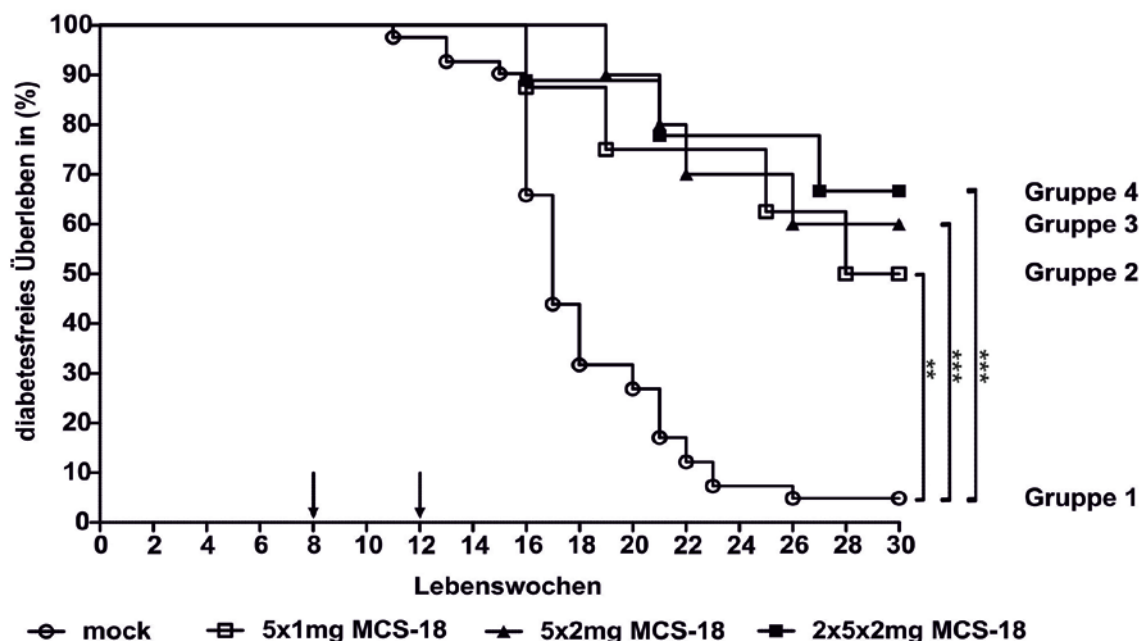
## Ergebnisse

gemeinschaftlich mit Yazid Resheq (Medizinische Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt.

### 3.4.1 Die Diabetesinzidenz sinkt bei MCS-18 behandelten NOD-Mäuse

Die prophylaktische Verabreichung von MCS-18 erfolgte in der 8. bzw. 8. und 12. Lebenswoche (s. Kap. 2.3.3). Insgesamt umfasste der Versuch 4 Tiergruppen. Gruppe 1 (n=41) stellt die Kontrollgruppe dar. Die Tiere aus Gruppe 2 (n=8) erhielten ab der 8. Lebenswoche 1 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus und die aus Gruppe 3 (n=10) ab der 8. Lebenswoche 2 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus. Den Tieren aus Gruppe 4 (n=9) wurde in der 8. und 12. Lebenswoche 2 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus verabreicht. Bei allen Tieren wurde ab der 10. Lebenswoche einmal wöchentlich die Glukosekonzentration des Harns mittels Teststäbchen bestimmt (s. Kap. 2.3.4). Bei einem Harnglukosewert von  $> 5,5$  mmol/l wurden die Tiere als diabetisch gewertet und durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet. Die Überlebenskurve der NOD-Mäuse, dargestellt nach Kaplan Meier, wurde mittels Log-Rank-Test auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft (Abb. 24). Im Vergleich zu unbehandelten Tieren führte die Behandlung mit MCS-18 zu einer signifikanten Reduktion der Diabetesinzidenz. Die höchste Diabetesinzidenz mit 95,1% trat bei den Kontrolltieren (Gruppe 1) auf. In dieser Gruppe erkrankten 39 der 41 Tiere an *Diabetes mellitus*. In Gruppe 2 lag die Inzidenz bei 50%. In dieser Gruppe manifestierte sich der *Diabetes mellitus* bei 4 von 8 Tieren ( $p < 0,01$ ). In Gruppe 3 wurden 4 von 10 Tieren hyperglykämisch, was einer Inzidenz von 40% entspricht ( $p < 0,001$ ). Die niedrigste Diabetesinzidenz, die bei 33,3% lag, konnte in Gruppe 4 festgestellt werden. In dieser Gruppe entwickelten lediglich 3 der 9 Tiere *Diabetes mellitus* ( $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse



**Abb. 24: Die Behandlung mit MCS-18 führt zu einer verminderten Diabetesinzidenz bei NOD-Mäusen.** Die prophylaktische Verabreichung von MCS-18 erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen während der 8. bzw. 12. Lebenswoche. Gruppe 1 (n=41) stellt die Kontrollgruppe dar. Die Tiere aus Gruppe 2 (n=8) erhielten ab der 8. Lebenswoche 1 mg MCS-18 bzw. die Tiere aus Gruppe 3 (n=10) 2 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus. Den Tieren aus Gruppe 4 (n=9) wurde in der 8. und 12. Lebenswoche 2 mg MCS-18 fünfmal im 2-Tages-Rhythmus verabreicht. Die Überlebenskurve der NOD-Mäuse, dargestellt nach Kaplan Meier, wurde mittels Log-Rank-Test auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Die Diabetesinzidenz der mit MCS-18 behandelten NOD-Mäuse liegt signifikant unter der Diabetesinzidenz der Kontrollgruppe (mock). Statistisch signifikante Werte sind gekennzeichnet mit  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*).

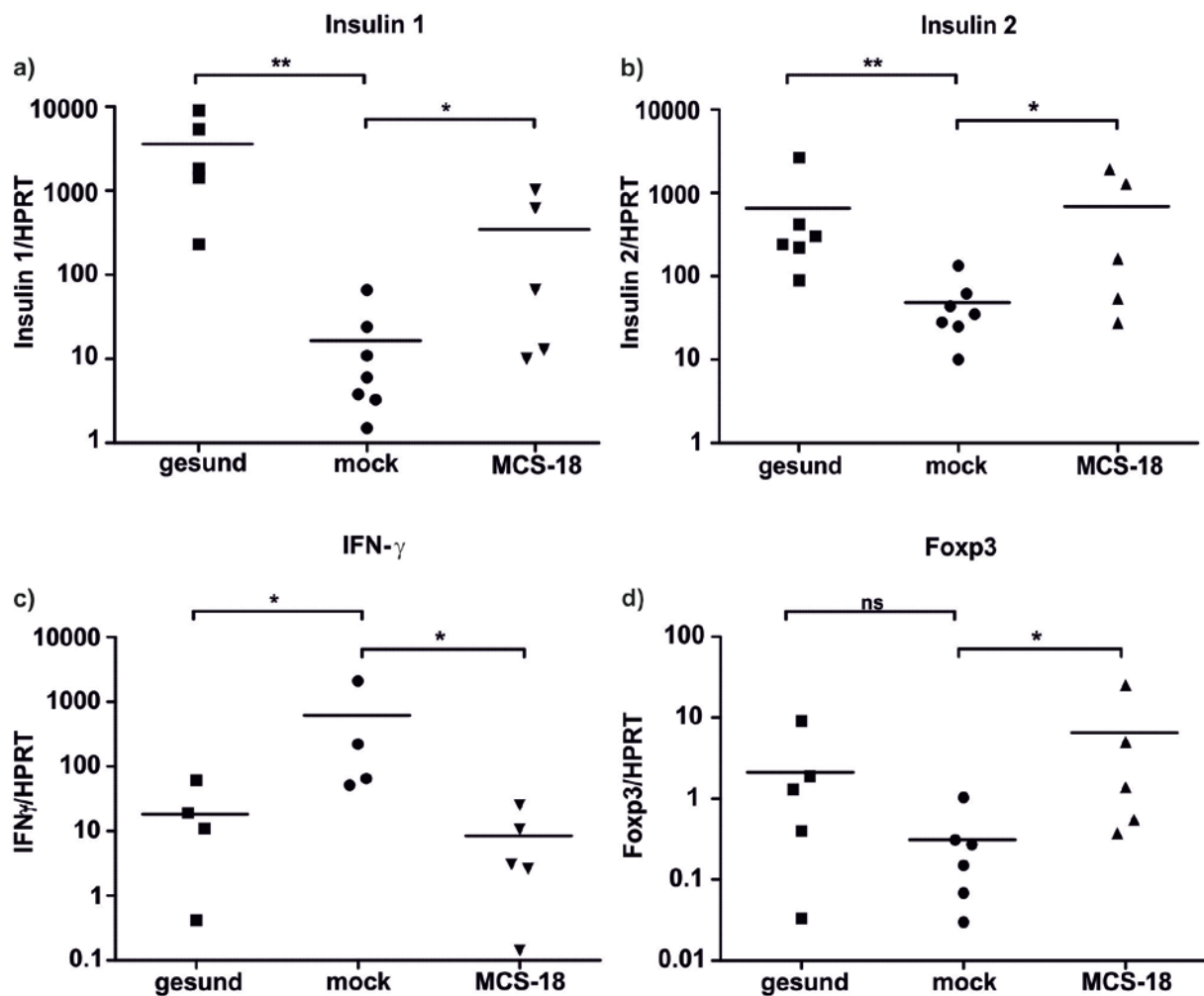
### 3.4.2 Analyse der IFN- $\gamma$ , Foxp3, Insulin 1 und Insulin 2 mRNA Expression des Pankreas mittels RT-PCR

Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse und Ratten zwei Insulingene, welche in etwa gleich stark exprimiert werden (Wentworth *et al.*, 1986). Um Unterschiede in der mRNA Expression der Gene Insulin 1, Insulin 2 sowie IFN- $\gamma$  und Foxp3 festzustellen, wurde das jeweilige Pankreas von 6-8 Wochen alten, unbehandelten und nicht diabetischen Tieren, von unbehandelten diabetischen Kontrolltieren und von MCS-18 behandelten, nicht diabetischen Tieren aus Gruppe 4 isoliert und mittels



## Ergebnisse

RT-PCR untersucht. In Abb. 25a, b ist die mRNA Expression für Insulin 1 und Insulin 2 dargestellt. Die MCS-18 behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression beider Insulin-Transkripte (Insulin 1  $p < 0,05$ , Insulin 2  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den diabetischen Kontrolltieren (mock).



**Abb. 25: RT-PCR Analyse für die mRNA-Expression für Insulin 1, Insulin 2, IFN- $\gamma$  und Foxp3 im Pankreas von NOD-Mäusen.** MCS-18 behandelte NOD-Mäuse (n=5) zeigen einen signifikanten Anstieg in der Expression von Insulin 1, Insulin 2 und Foxp3 gegenüber den erkrankten Kontrolltieren in **a)** n=7, in **b)** n=7, in **c)** n=4. Die Interferon-gamma Expression war bei den mit MCS-18 behandelten Tieren (n=5) signifikant reduziert gegenüber den erkrankten Kontrolltieren (n=4). Die p-Werte wurden nach dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Statistisch signifikante Werte sind mit  $p < 0,05$  (\*) und  $p < 0,01$  (\*\*) gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: Foxp3: forkhead box P3, HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, INF- $\gamma$ : Interferon-gamma, ns: nicht signifikant

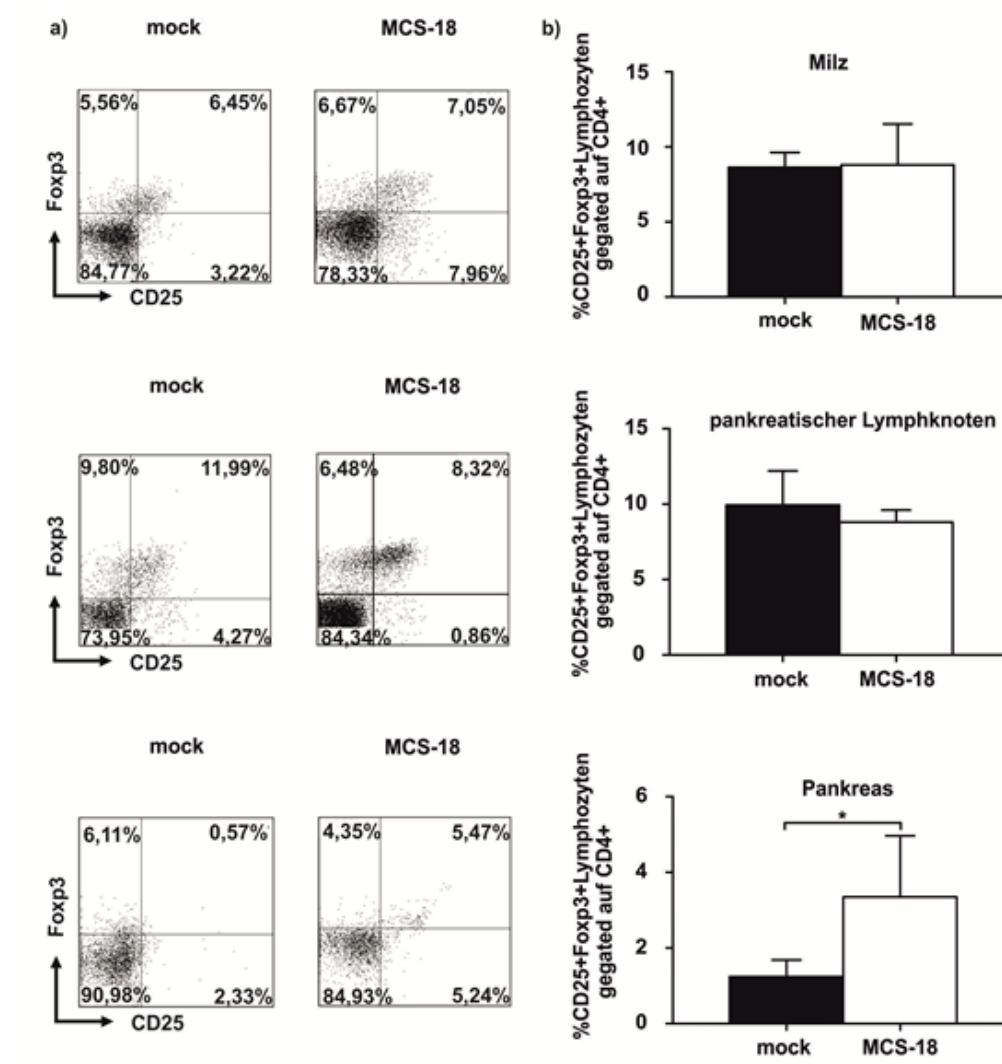
## Ergebnisse

Die p-Werte wurden nach dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Der Unterschied zwischen unbehandelten gesunden Kontrollmäusen und diabetischen Kontrolltieren in der Expression der beiden Insulin-Transkripte war ebenfalls signifikant (Insulin 1  $p < 0,01$ , Insulin 2  $p < 0,01$ ). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den MCS-18 behandelten Mäusen in der Insulin 1-, und Insulin 2-mRNA Expression nachweisen. Eine signifikante Reduktion der IFN- $\gamma$  mRNA Expression im Pankreas zeigte sich bei den MCS-18 behandelten Tieren ( $p < 0,05$ ) sowie unbehandelten gesunden Mäusen ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Kontrolltieren (Abb. 25c). Es konnte kein wesentlicher Unterschied in der IFN- $\gamma$  mRNA Expression zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den MCS-18 behandelten Tieren festgestellt werden. Foxp3 (forkhead box P3) wurde erstmals 2001 beschrieben (Brunkow *et al.*, 2001) und gehört zur Familie der Forkhead-box-Transkriptionsfaktoren (s. Kap. 1.4.). Das Molekül Foxp3 wird spezifisch von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs exprimiert (Zheng and Rudensky, 2007) und als Marker zur Identifikation von Tregs herangezogen. In der Gruppe der MCS-18 behandelten Tiere war Foxp3 signifikant höher exprimiert ( $p < 0,05$ ) als in den unbehandelten diabetischen Kontrolltieren. Der Unterschied in der Foxp3 Expression bei MCS-18 behandelten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren war nicht signifikant (Abb. 25d). Auch zwischen den unbehandelten gesunden Mäusen und den diabetischen Kontrollmäusen war der Unterschied in der Foxp3 Expression nicht signifikant.

### **3.4.3 Die Expression von Foxp3<sup>+</sup> Zellen in Milz, pankreatischen Lymphknoten (PLN) und Pankreas**

Um die organ-spezifische Verteilung von Treg in MCS-18 behandelten NOD-Mäusen und den unbehandelten Kontrolltieren zu vergleichen, wurde die Milz, der pankreatische Lymphknoten sowie das Pankreas, wie in Kap. 2.3.5.2 und 2.3.5.3 beschrieben, gewonnen und die Zellen mittels FACS-Analyse untersucht (Abb. 26).

## Ergebnisse



**Abb. 26: Nachweis von regulatorischen T-Zellen in der Milz, pankreatischen Lymphknoten und Pankreas mittels Durchflusszytometrie.** Die aus den Organen isolierten Zellen wurden immunologisch für CD4, CD25 und Foxp3 markiert und mittels FACS analysiert. **a)** Zeigt exemplarisch FACS Daten. **b)** Zeigt die Zusammenfassung von 5 Tieren pro Gruppe. In der Milz sowie im pankreatischen Lymphknoten wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fop3<sup>+</sup>Zellen zwischen den unbehandelten Kontrolltieren (n=5) und den MSC-18 behandelten Tieren (n=5) festgestellt. Der Unterschied in der Expression CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fop3<sup>+</sup>Zellen im Pankreas von MCS-18 behandelter Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (n=5) war signifikant. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe der Mittelwerte (MW) und die Standardabweichung (SD). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Statistisch signifikante Werte sind gekennzeichnet mit  $p < 0,05$  (\*). Verwendete Abkürzungen: CD: cluster of differentiation, FACS: fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, Foxp3: forkhead box P3.

## Ergebnisse

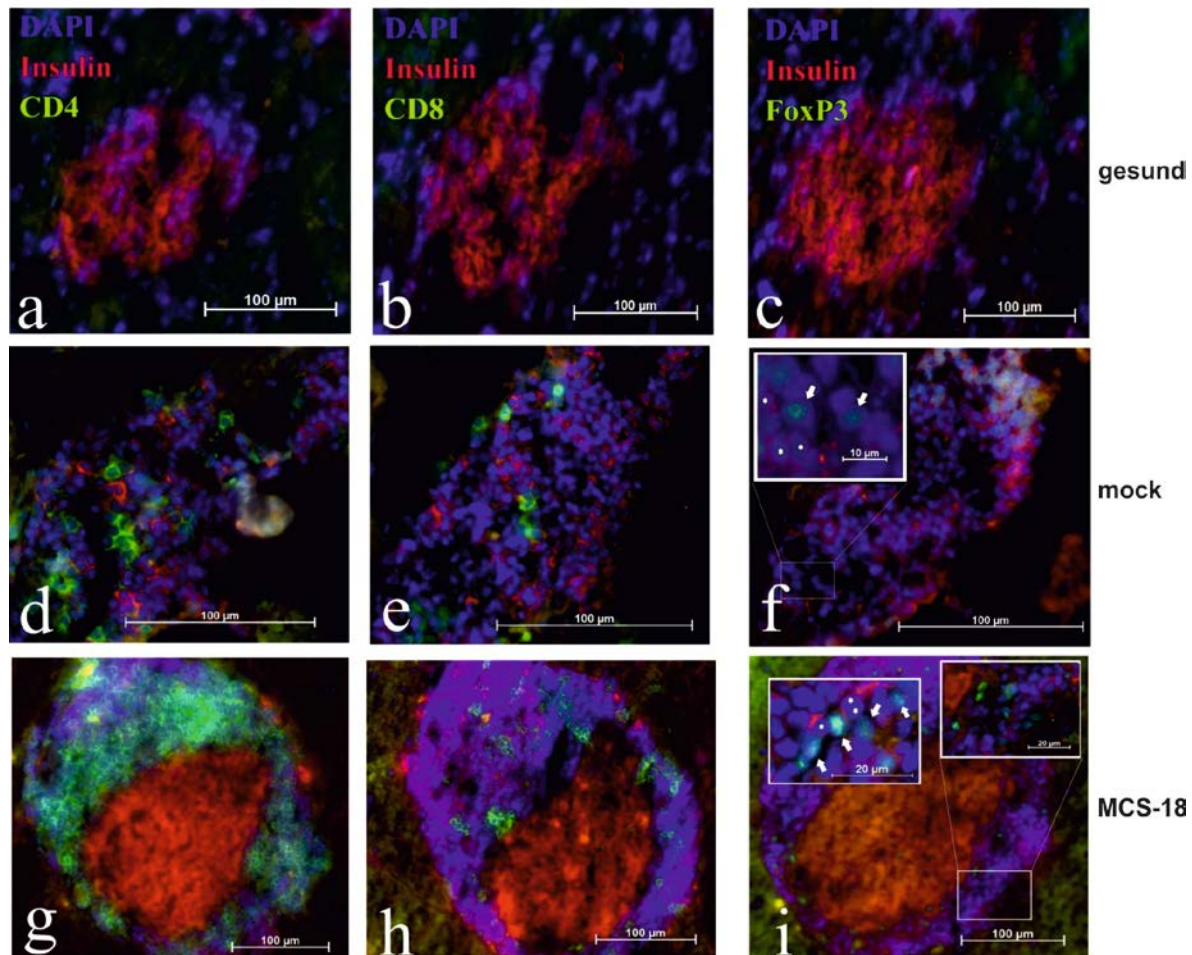
Treg sind positiv für die Marker CD4, CD25 und Foxp3 und können durch die Oberflächenmarkierung für CD4 und CD25 sowie durch die intrazelluläre Färbung für Foxp3 identifiziert werden (Abb. 26a). Wie in Abb. 26b gezeigt, ist kein signifikanter Unterschied (Milz:  $p=0,9108$  bzw. PLN:  $p=0,3255$ ) in der Anzahl der vorhandenen Treg zwischen den behandelten (Milz ( $n=5$ ):  $8,80 \pm 2,73\%$  bzw. PLN ( $n=5$ ):  $8,9 \pm 0,81\%$ ) und den unbehandelten Kontrolltieren (Milz ( $n=5$ ):  $8,65 \pm 0,98\%$  bzw. PLN ( $n=5$ ):  $9,94 \pm 2,27\%$ ) zu erkennen. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Im Pankreas der mit MCS-18 behandelten, diabetesfreien Mäuse konnte ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T-Zellen festgestellt werden ( $1,24 \pm 0,44\%$  (mock) vs.  $3,35 \pm 1,62\%$  (MCS-18))

### **3.4.4 Immunhistologischer Nachweis von $CD4^+$ , $CD8^+$ und $Foxp3^+$ positiven Zellen im Pankreas der NOD-Maus**

Das Pankreas von MCS-18 behandelten und unbehandelten gesunden und an *Diabetes mellitus* erkrankten Mäusen wurde, wie in Kap. 2.3.5.3 beschrieben, entnommen. Die daraus hergestellten Gefrierschnitte wurden immunhistochemisch markiert (s. Kap. 2.3.8.2), um eingewanderte  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und regulatorische T-Zellen darzustellen. Durch die spezifische Färbung dieser Zellen und der insulinproduzierenden Langerhans'schen Inseln war es möglich, eine klare Aussage über den morphologischen Zustand der Inseln, sowie der dort vorgefundenen Zellen, zu treffen. Die unbehandelten erkrankten Kontrolltiere (Abb. 27, d-f) wiesen, im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (Abb. 27, a-c), eine sehr starke Infiltration von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen (beide grün) auf. Des Weiteren war bei diesen Tieren ein verminderter Insulingehalt (rot) in den Langerhans'schen Inseln nachweisbar. Bei den durch die MCS-18 Behandlung protektierten Mäusen fällt eine starke Infiltration  $Foxp3^+$  T-Zellen (grün) auf (Abb. 27i). Auch bei den MCS-18 behandelten Tieren

## Ergebnisse

(Abb. 27g, h) konnte wie bei den erkrankten Kontrolltieren (Abb. 27, a-c) eine starke Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (beide grün) festgestellt werden.



**Abb. 27: Immunhistologische Darstellung von Insulin, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen.** Die aus dem Pankreasgewebe hergestellten Gefrierschnitte wurden immunhistochemisch für CD4, CD8, Foxp3 und Insulin markiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Langerhans'schen Inseln optisch dargestellt. **(a-c)** zeigt Inseln einer gesunden, unbehandelten Kontrollmaus. **(d-f)** zeigt eine Insel einer erkrankten unbehandelten Kontrollmaus. **(g-i)** zeigt eine Insel einer MCS-18 behandelten NOD-Maus. Insulin (porcines Insulin 1:50 bzw. TRITC, 1:50): rot **(a-i)**; Zellkerne (DAPI, 1:1000): blau **(a-i)**; CD4<sup>+</sup> T-Zellen: grün **(a,d,g)**; CD8<sup>+</sup> T-Zellen: grün **(b,e,h)**; Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen: grün **(c,f,i)**; Die primären Antikörper (s. Kap. 2.2.7.6) wurden in einer Verdünnung von 1:100 für CD4, CD8 und Foxp3 eingesetzt. Der biotinylierte, sekundäre Antikörper und das Fluorophor Streptavidin-Alexa Fluor 488 (grün) wurden in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt. Im Vergrößerungsausschnitt sind die Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit einem weißen Pfeil markiert **(f,i)**.

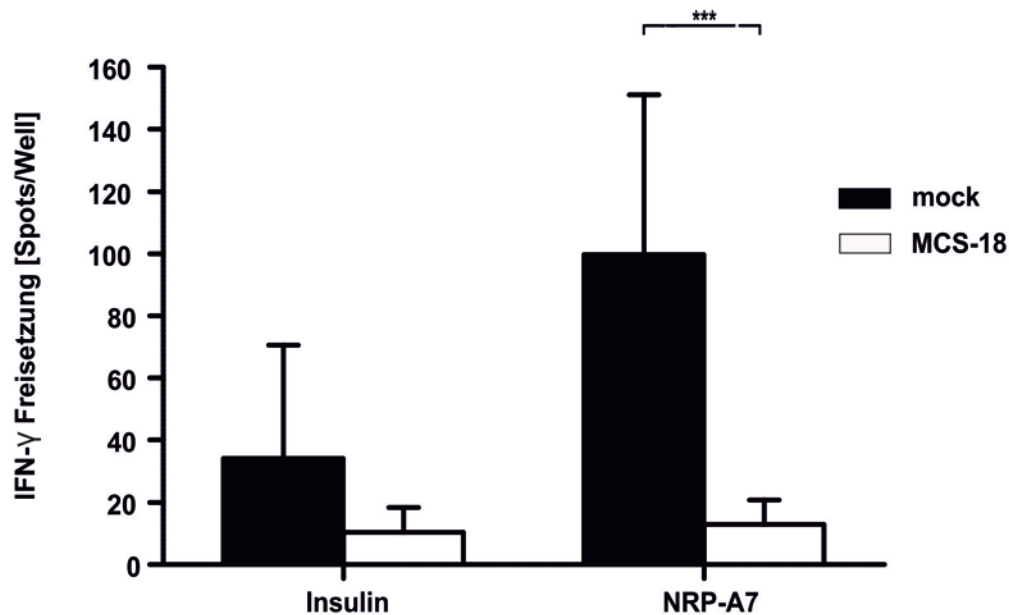
## Ergebnisse

Durch die Untersuchung mittels FACS- und RT-PCR Analyse konnte eine signifikante Erhöhung der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in den Pankreata der MCS-18 behandelten Tiere ermittelt werden. Durch die immunhistochemischen Analysen der Pankreata und deren Auswertung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte auch optisch eine vermehrte Ansammlung Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in den Langerhans'schen Inseln der MCS-18 behandelten Tiere aufgezeigt werden.

### **3.4.5 Nachweis von Peptid-spezifischen, IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen in der Milz**

Der Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen aus der Milz erfolgte mit Hilfe des Elispot-Assay. Hierfür wurden die Milzen von unbehandelten Kontrollmäusen (n=10) und von MCS-18 behandelten Tiere (n=10) entnommen und die Zellen auf ihre IFN- $\gamma$  Sekretion hin untersucht. Die Stimulation erfolgte mit den Peptiden Insulin und NRP-A7 (s. Kap. 2.2.7.9). Wie in Abb. 28 zu erkennen, konnte bei unbehandelten Mäusen (mock:  $100 \pm 51$  Spots/Well) im Vergleich zu MCS-18 behandelten Mäusen ( $13 \pm 8$  Spots/Well) eine starke NRP-A7 spezifische T-Zell-Aktivierung beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). Die Stimulation der Zellen mit einem Insulin-spezifischen Peptid zeigte ebenfalls eine, wenn auch nicht so deutlich, ausgeprägte Reduktion der T-Zellstimulation (mock:  $34 \pm 37$  Spots/Well vs. MCS-18:  $10 \pm 8$  Spots/Well). Dieser Versuch hat gezeigt, dass isolierte T-Zellen aus der Milz von unbehandelten Kontrolltieren eine signifikant höhere IFN- $\gamma$  Sekretion auf die Stimulation der Zellen mit NRP-A7 aufweisen, als die der von MCS-18 behandelten Tieren.

## Ergebnisse



**Abb. 28: IFN- $\gamma$  Elispot der isolierten Milzzellen von unbehandelten Kontrolltieren und MCS-18 behandelten Tieren.** Bei unbehandelten Kontrolltieren (n=10) und den MCS-18 behandelten Tieren (n=10) konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IFN- $\gamma$  Freisetzung in den Insulin-stimulierten T-Zellen beobachtet werden. Die IFN- $\gamma$  Freisetzung durch NRP-A7 Stimulation war in den Milzzellen der MCS-18 behandelten Tiere signifikant erniedrigt. Statistisch signifikante Werte sind mit  $p < 0,001$  (\*\*\*) gekennzeichnet. Die p-Werte wurden nach dem Student's t-Test berechnet. Verwendete Abkürzungen: INF- $\gamma$ : Interferon-gamma, NRP-A7: Mimotopes Antigen mit der Aminosäuresequenz KYNKANAFI.

## 4 Diskussion

### 4.1 MCS-18 verhindert die Expression DZ-spezifischer Reifungsmarker

DZ sind die einzigen Antigen-präsentierenden Zellen, welche in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren und auf diese Weise primäre Immunantworten zu induzieren. Während ihrer Reifung exprimieren sie kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD86 und CD83. Zudem exprimieren vollständig gereifte DZ MHCII-Moleküle und können somit eine Stimulation der T-Zellen hervorrufen (s. Kap. 1.3) (Banchereau and Steinman, 1998; Fujii *et al.*, 2004). Diese aktivierten T-Zellen sekretieren Zytokine und Chemokine, welche ihrerseits weiter die DZ-T Zellinteraktion verstärken (Pope, 2003).

In früheren Untersuchungen an humanen DZ konnte gezeigt werden, dass MCS-18 die Expression der Reifungsmarker CD80, CD86 und CD83 konzentrationsabhängig reduziert (Horstmann *et al.*, 2007). Inwieweit MCS-18 auch Einfluss auf die Expression typischer Oberflächenmoleküle muriner DZ hat, wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Mittels FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass MCS-18 mit steigender Konzentration eine Abnahme in der Expression der Oberflächenmoleküle CD40 und CD83 hervorruft.

Der CD40-CD154 Signalweg spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der B-Zellaktivierung, sondern ist auch für die T-Zellaktivierung essentiell (Durie *et al.*, 1994). Die Behandlung von 3-4 Wochen alten weiblichen NOD-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper (mAB) gegen den murinen CD40-Rezeptor (CD40L/CD154) schützt die Tiere vor einer *Insulitis* und der Ausbildung eines manifesten *Diabetes mellitus* (Balasa *et al.*, 1997). Auch im EAE-Modell, einem Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose (MS), konnten die Tiere durch die Behandlung mit diesem mAB gegen CD40L vor dem Ausbruch der Erkrankung geschützt werden (Gerritse *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1999).



## Diskussion

Durch MCS-18 konnte auch eine deutlich konzentrationsabhängige Reduktion der CD83 Expression nachgewiesen werden. Die Expression des Oberflächenmoleküls CD83 ist dabei charakteristisch für reife DZ (Zhou *et al.*, 1992). Wird die CD83 Expression auf humanen DZ durch eine Blockade des CD83 mRNA Transportes vom Zellkern ins Zytoplasma verhindert, so zeigen diese DZ eine verminderte Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren (Kruse *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu steigert sich diese Fähigkeit bei einer vorübergehenden Überexpression von CD83 in humanen DZ (Aerts-Toegaert *et al.*, 2007). In diesen DZ konnte die Expression von CD83 während der DZ-Reifung auch durch die Infektion mit dem Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) unterdrückt werden (Salio *et al.*, 1999). Eine HSV-1 Infektion reifer humaner DZ führte zu einer sofortigen Herabregulierung von CD83. Andere kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 waren, z.B. aufgrund bzw. infolge einer Infektion mit HSV-1, in ihrer Expression nicht beeinflusst. Diese infizierte DZ zeigten eine verminderte Aktivität in der T-Zellstimulation (Kruse *et al.*, 2000), was darauf hinweist, dass CD83 entscheidend für die T-Zell-Aktivierung war. Es existieren zwei Protein-Isoformen von CD83: eine membrangebundene (Zhou and Tedder, 1995) und eine lösliche Form (Hock *et al.*, 2001). Während die auf DZ exprimierte membrangebundene Form eine für das Immunsystem stimulierende Funktion durch die Aktivierung von T-Zellen einnimmt, hat die lösliche Form einen hemmenden Effekt auf das Immunsystem. So zeigten humane DZ, die mit der löslichen Form des CD83 inkubiert wurden, eine verminderte Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren (Lechmann *et al.*, 2001). Zudem führte die prophylaktische und therapeutische Gabe des humanen löslichen CD83 zu einer Reduktion der klinischen Symptomatik bei Mäusen im EAE-Modell (Zinser *et al.*, 2004).

Eine konzentrationsabhängige, durch MCS-18 hervorgerufene Unterdrückung in der Expression von CD83 in humanen DZ, sowie eine stark eingeschränkte Fähigkeit dieser allogene T-Zellen zu stimulieren, konnte von Horstmann *et al.* (2007) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch MCS-18 eine Reduktion in der CD83 Expression auf murinen DZ festgestellt werden. MCS-18 behandelte murine DZ wiesen zudem eine konzentrationsabhängig verminderte Fähigkeit auf, allogene

T-Zellen zu stimulieren. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bis *dato* mit unreifen DZ, die als tolerogene Modulatoren des Immunsystems bei Autoimmunerkrankungen und Allergien fungieren (Hackstein and Thomson, 2004). Tolerogene DZ können *in vitro* u.a. durch die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren, wie z.B. Corticosteroiden (Bellinghausen *et al.*, 2001; Bros *et al.*, 2007), generiert werden. Durch diese Inhibitoren kommt es zu einer verminderten Expression von kostimulatorischen Molekülen, einer reduzierten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, sowie einer verminderten T-Zell-Aktivierungskapazität der DZ (Adorini *et al.*, 2004). Diese pharmakologischen Substanzen haben aber auch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen. So wird unter anderem das Überleben und das Migrationsverhalten der DZ negativ beeinflusst (Penna and Adorini, 2000). Mit MCS-18 ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die Expression von CD40 und CD83 auf DZ herabzusetzen und eine verminderte DZ-vermittelte T-Zell-Aktivierung hervorzurufen. Durch eine Annexin V- und Propidium-Jodid Färbung wurde nahezu ausgeschlossen, dass die beobachtete Reduktion der Oberflächenexpression auf MCS-18 behandelten DZ auf toxische Effekte zurückzuführen war.

### **4.2 Inhibitorische Wirkung von MCS-18 auf murine B-Zellen**

B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Autoreaktive B-Zellen produzieren nicht nur Autoantikörper (Fritzler, 2008), sondern sind auch darauf spezialisiert, den T-Zellen Autoantigene zu präsentieren (Constant *et al.*, 1995). Des Weiteren können diese B-Zellen die Selbstzerstörung durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Harris *et al.*, 2000) verstärken. Neben pathogenen Eigenschaften von B-Zellen in Autoimmunerkrankungen haben diese auch regulatorische und protektive Funktionen. So konnte in Studien gezeigt werden, dass B-Zellen das Fortschreiten der Autoimmunerkrankung supprimieren oder das Ausheilen einer Entzündung verbessern (Matsushita *et al.*, 2008; Mauri and Ehrenstein, 2008; Shimomura *et al.*, 2008). Die funktionellen Eigenschaften von B-Zellen im Rahmen von

## Diskussion

Autoimmunerkrankungen sind folglich sehr komplex, da sie sowohl immunpathogen als auch immunregulatorisch wirken können. Ein idealer Therapieansatz würde pathogene Funktionen der B-Zellen inhibieren, gleichzeitig aber deren regulatorische Funktionen fördern.

Um den Einfluss von MCS-18 auf murine B-Zellen zu untersuchen, wurden die bei der MACS-Separation gewonnenen und mit MCS-18 behandelten Zellen mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporationstest auf ihre Proliferationseigenschaften untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration an MCS-18 die Proliferationsfähigkeit der Zellen abnahm.

In typischen Autoimmun-Mausmodellen, wie der durch Kollagen induzierten Arthritis (CIA), dem Typ 1 *Diabetes* (T1D) und der experimentellen autoimmunen *Encephalomyelitis* (EAE), spielen B-Zellen für die Entwicklung der Krankheit eine herausragende Rolle (Lyons *et al.*, 1999; Serreze *et al.*, 1996; Svensson *et al.*, 1998). Hu *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Depletion von B-Zellen in NOD-Mäusen diese vor dem Ausbruch des T1D schützt. Des Weiteren konnte die Gruppe in dieser Studie zeigen, dass sich in Mäusen, in denen die B-Zellen depletiert wurden, der Anteil der  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  Zellen in der Milz signifikant erhöhte (Hu *et al.*, 2007). Gegenteiliges zeigt allerdings eine Arbeit von Tian *et al.* (2001), in welcher NOD-Mäuse vor dem Ausbruch des Typ1 *Diabetes* durch LPS-aktivierte B-Zellen geschützt wurden (Tian *et al.*, 2001). Warum genau die B-Zelldepletion in vielen autoimmun bedingten Mausmodellen therapeutisch wirksam ist, muss noch genauer erforscht werden.

Um zu prüfen, ob und inwieweit MCS-18 Einfluss auf die Antikörperproduktion von Plasmazellen hat, wurde in der vorliegenden Arbeit der Überstand der mit LPS stimulierten und MCS-18 behandelten B-Zellen mittels ELISA untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Sekretion der Immunglobulinsubklassen IgM und IgG2b, als auch die durch unterschiedliche Stimulation der B-Zellen hervorgerufene Sekretion von IgG1, IgG2a und IgG2b mit steigender Konzentration an MCS-18 abnahm.

### 4.3 MCS-18 im NOD-Mausmodell

Die durch MCS-18 hervorgerufene verminderte Proliferation der B-Zellen könnte protektiv auf die Entstehung des T1D wirken. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Substanz im NOD-Mausmodell *in vivo* eingesetzt. Dabei wurde die Wirkung von MCS-18 sowohl *in vivo* an Hand des NOD-Mausmodells, als auch *in vitro* in isolierten NOD-DZ genauer untersucht.

DZ sind die ersten Immunzellen, die während der Entwicklung der autoimmunbedingten *Insulitis* in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas vorzufinden sind (Rosmalen *et al.*, 1997; Shinomiya *et al.*, 2000). Einige Studien zeigten, dass eine Veränderung der DZ-Funktion verantwortlich für die Entwicklung des T1D war. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der Anstieg an mDZ in NOD-Mäusen, genauso wie ein Defekt in der NF- $\kappa$ B Regulation, der Auslöser dafür sein könnte (Steptoe *et al.*, 2002; Weaver, Jr. *et al.*, 2001). Durch eine kurzzeitige Depletion von DZ in prädiabetischen Mäusen konnte jedoch keine Lymphozyteninfiltration in den Langerhans'schen Inseln festgestellt werden (Nikolic *et al.*, 2005).

MCS-18 verhindert die komplette Ausreifung von DZ, so dass diese in einem immaturren bzw. semi-maturren Zustand verbleiben. Semi-mature DZ sind an der Induktion und Aufrechterhaltung von tolerogenen Mechanismen einschließlich der Induktion und Aktivierung von regulatorischen T-Zellen beteiligt (Banchereau and Steinman, 1998; Lutz and Schuler, 2002).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch MCS-18 modulierten DZ Treg induzieren, die ihrerseits die diabetogenen Effektor-T-Zellen inhibieren. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit ein Anstieg von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Pankreas bei MCS-18 behandelten Tieren festgestellt werden. Bei der Aufrechterhaltung der Toleranz und bei der Kontrolle des T1D in NOD-Mäusen spielen Treg eine essentielle Rolle (Chen *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2003). Machen *et al.* (2004) beschreibt in seiner Studie einen Anstieg von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in NOD-Mäusen nach Injektion von DZ, bei welchen kostimulatorische Moleküle herunterreguliert

## Diskussion

waren. Diese Tiere waren vor dem Ausbruch des Typ1 *Diabetes* geschützt (Machen *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde beschrieben, dass es durch GM-CSF modulierte DZ zu einer verbesserten regulatorischen Funktion der Treg kam und sich der Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung in NOD-Mäusen verzögerte (Cheatem *et al.*, 2009).

Es ist aber auch bekannt, dass Treg die Funktion von DZ beeinflussen können. So konnte gezeigt werden, dass die mit Treg kokultivierten immaturen DZ eine verringerte Fähigkeit aufwiesen, naive T-Zellen zu aktivieren (Cederbom *et al.*, 2000). Zudem wird angenommen, dass Treg ihre supprimierende Aktivität auch durch die Herabregulierung der DZ-Funktion erlangen. So konnte durch die Depletion von Treg *in vivo* eine Aktivierung und Reifung von DZ und eine ungehinderte Entwicklung von Effektor-T-Zellen hervorgerufen werden, wodurch es zur Entwicklung von Autoimmunität kam (Kim *et al.*, 2007). Weiterführende Experimente müssen klären, ob MCS-18 die Treg durch eine verminderte DZ-Funktion beeinflusst oder ob sie direkt durch MCS-18 aktiviert werden können. Beides könnte zu einer Reduktion der diabetogenen Effektor-T-Zellen sowie deren Zytokinexpression führen.

In diesem Zusammenhang konnte, durch die *in vitro* Restimulation von Milzzellen aus MCS-18 behandelten Tieren, in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass diese eine signifikant verminderte IFN- $\gamma$  Sekretion aufwiesen. Folglich besitzen die mit MCS-18 behandelten Tiere weniger Antigen-spezifische autoaggressive Th1-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass es durch den durch MCS-18 hervorgerufenen Anstieg der Treg zu einer Reduktion von IFN- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen kommt und deren Ausdifferenzierung durch Treg somit verhindert wird (Tritt *et al.*, 2008).

Zusammenfassend zeigt MCS-18 ein sehr interessantes Wirkungsspektrum der Immunsuppression im Tiermodell des T1D und könnte daher eine viel versprechende Option für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen darstellen.

## 5 Literaturverzeichnis

Achenbach, P., Warncke, K., Reiter, J., Williams, A. J., Ziegler, A. G., Bingley, P. J., and Bonifacio, E. (2006) Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives. *Diabetologia* **49**, 2969-2976.

Acosta-Rodriguez, E. V., Merino, M. C., Montes, C. L., Motran, C. C., and Gruppi, A. (2007) Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 73-83.

Adams, S., O'Neill, D. W., and Bhardwaj, N. (2005) Recent advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol.* **25**, 177-188.

Adorini, L., Giarratana, N., and Penna, G. (2004) Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**, 127-134.

Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuybaerts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K., and Breckpot, K. (2007) CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* **37**, 686-695.

Albert, L. J. and Inman, R. D. (1999) Molecular mimicry and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* **341**, 2068-2074.

Alison, M. R. and Sarraf, C. E. (1992) Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *J. R. Coll. Physicians Lond.* **26**, 25-35.

American Diabetes Association (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **35 Suppl 1**, S64-S71.

Amiguet, P., Brunner, J., and Tschopp, J. (1985) The membrane attack complex of complement: lipid insertion of tubular and nontubular polymerized C9. *Biochemistry* **24**, 7328-7334.

Andersson, J., Sjöberg, O., and Møller, G. (1972) Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. *Eur. J. Immunol.* **2**, 349-353.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**, 387-396.

## Literaturverzeichnis

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001) Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**, 1144-1150.

Babu, S. R. and Eisenbarth, G. S. (2012) Juvenile diabetes. *Indian J. Med. Res.* **136**, 179-181.

Bach, J. F. (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* **15**, 516-542.

Backstrom, E., Kristensson, K., and Ljunggren, H. G. (2004) Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scand. J. Immunol.* **60**, 14-22.

Baekkeskov, S., Aanstoot, H. J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., and De, C. P. (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* **347**, 151-156.

Balasa, B., Krah, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H. O., and Sarvetnick, N. (1997) CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **159**, 4620-4627.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811.

Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.

Baum, H., Davies, H., and Peakman, M. (1996) Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? *Immunol. Today* **17**, 64-70.

Bedford, P., Garner, K., and Knight, S. C. (1999) MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int. Immunol.* **11**, 1739-1744.

Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A. H., Knop, J., and Saloga, J. (2001) Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 242-249.

## Literaturverzeichnis

Bennett, C. L. and Ochs, H. D. (2001) IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr. Opin. Pediatr.* **13**, 533-538.

Berke, G. (1995) The CTL's kiss of death. *Cell* **81**, 9-12.

Bertrams, J. (1984) The HLA association of insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Behring Inst. Mitt.* 89-99.

Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, 345-350.

Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., and Banchereau, J. (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 41-52.

Bros, M., Jahrling, F., Renzing, A., Wiechmann, N., Dang, N. A., Sutter, A., Ross, R., Knop, J., Sudowe, S., and Reske-Kunz, A. B. (2007) A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood* **109**, 3820-3829.

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., and Ramsdell, F. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68-73.

Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* **179**, 1317-1330.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van, K. C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* **180**, 1263-1272.

Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1538-1543.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752.



## Literaturverzeichnis

Chatila, T. A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H. M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A. M. (2000) JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest* **106**, R75-R81.

Cheatem, D., Ganesh, B. B., Gangi, E., Vasu, C., and Prabhakar, B. S. (2009) Modulation of dendritic cells using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) delays type 1 diabetes by enhancing CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Clin. Immunol.* **131**, 260-270.

Chen, Z., Herman, A. E., Matos, M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005) Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **202**, 1387-1397.

Cline, A. M. and Radic, M. Z. (2004) Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin. Immunol.* **112**, 175-182.

Coates, P. T., Colvin, B. L., Hackstein, H., and Thomson, A. W. (2002) Manipulation of dendritic cells as an approach to improved outcomes in transplantation. *Expert. Rev. Mol. Med.* **4**, 1-21.

Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P., and Bottomly, K. (1995) B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J. Immunol.* **155**, 3734-3741.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2480-2488.

DeKruyff, R. H., Mosmann, R. R., and Umetsu, D. T. (1990) Induction of antibody synthesis by CD4+ T cells: IL 5 is essential for induction of antigen-specific antibody responses by TH2 but not TH1 clones. *Eur. J. Immunol.* **20**, 2219-2227.

Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes (2012) *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes*. Kirchheim & Co GmbH.

Devendra, D. and Eisenbarth, G. S. (2003) 17. Immunologic endocrine disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S624-S636.

Dodds, A. W., Sim, R. B., Porter, R. R., and Kerr, M. A. (1978) Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem. J.* **175**, 383-390.

## Literaturverzeichnis

Doyle, C. and Strominger, J. L. (1987) Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**, 256-259.

Driver, J. P., Serreze, D. V., and Chen, Y. G. (2011) Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin. Immunopathol.* **33**, 67-87.

Durie, F. H., Foy, T. M., Masters, S. R., Laman, J. D., and Noelle, R. J. (1994) The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol. Today* **15**, 406-411.

Esser, A. F. (1991) Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today* **12**, 316-318.

Fritzler, M. J. (2008) Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun. Rev.* **7**, 616-620.

Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J., and Steinman, R. M. (2004) The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* **199**, 1607-1618.

Galvan, M. D., Greenlee-Wacker, M. C., and Bohlson, S. S. (2012) C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 489-497.

Gerke, V. and Moss, S. E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* **82**, 331-371.

Germain, R. N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-299.

Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Boersma, W. J., and Claassen, E. (1996) CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2499-2504.

Gerstein, H. C. (1994) Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* **17**, 13-19.

Gillespie, K. M. (2006) Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* **175**, 165-170.

## Literaturverzeichnis

Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St, G. B., and Vinuesa, C. G. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597.

Gorski, J. P., Hugli, T. E., and Muller-Eberhard, H. J. (1979) C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5299-5302.

Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.

Grant, S. F., Hakonarson, H., and Schwartz, S. (2010) Can the genetics of type 1 and type 2 diabetes shed light on the genetics of latent autoimmune diabetes in adults? *Endocr. Rev.* **31**, 183-193.

Groop, L. C., Bottazzo, G. F., and Doniach, D. (1986) Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. *Diabetes* **35**, 237-241.

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P., and Ley, T. J. (2004) Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-2848.

Haanen, C. and Vermes, I. (1995) Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm.* **4**, 5-15.

Hackstein, H. and Thomson, A. W. (2004) Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 24-34.

Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., and Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 475-482.

Hock, B. D., Kato, M., McKenzie, J. L., and Hart, D. N. (2001) A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int. Immunol.* **13**, 959-967.

Honeyman, M. C., Coulson, B. S., and Harrison, L. C. (2000a) A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1835.

Honeyman, M. C., Coulson, B. S., and Harrison, L. C. (2000b) A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1835-1837.

## Literaturverzeichnis

Honeyman, M. C., Coulson, B. S., and Harrison, L. C. (2000c) A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1835.

Horstmann, B., Zinser, E., Turza, N., Kerek, F., and Steinkasserer, A. (2007) MCS-18, a novel natural product isolated from *Helleborus purpurascens*, inhibits dendritic cell activation and prevents autoimmunity as shown in vivo using the EAE model. *Immunobiology* **212**, 839-853.

Howard, L. M., Miga, A. J., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C., Laman, J. D., Noelle, R. J., and Miller, S. D. (1999) Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest* **103**, 281-290.

Hu, C. Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F. S., Shlomchik, M. J., and Wen, L. (2007) Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J. Clin. Invest* **117**, 3857-3867.

Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K. R., and Humphreys-Beher, M. G. (1992) Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol.* **263**, E607-E614.

Hyoty, H. and Taylor, K. W. (2002) The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* **45**, 1353-1361.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. (1993) Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **178**, 479-488.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702.

Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, Germain, R. N., Mellman, I., and Steinman, R. M. (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* **191**, 927-936.

Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J., and Steinman, R. M. (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* **180**, 1849-1860.

## Literaturverzeichnis

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* **162**, 5317-5326.

Janeway (2002) *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin.

Jetten, A. M. (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e003.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y. H., Dakhama, A., and Gelfand, E. W. (2007) Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J. Immunol.* **178**, 1433-1442.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A. H. (2001) Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* **22**, 394-400.

Keegan, A. D. and Paul, W. E. (1992) Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunol. Today* **13**, 63-68.

Kerek, F., Stimac, R., Apell, H. J., Freudenmann, F., and Moroder, L. (2002) Characterization of the macrocyclic carbon suboxide factors as potent Na,K-ATPase and SR Ca-ATPase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**, 213-220.

Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 223-246.

Kikutani, H. and Makino, S. (1992) The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* **51**, 285-322.

Kim, J. M., Rasmussen, J. P., and Rudensky, A. Y. (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **8**, 191-197.

Kimura, A. and Kishimoto, T. (2011) Th17 cells in inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 319-322.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833-844.

## Literaturverzeichnis

Koyasu, S. and Moro, K. (2011) Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology* **132**, 475-481.

Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., Schuler, G., Hauber, J., and Steinkasserer, A. (2000) Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J. Virol.* **74**, 7127-7136.

Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E., and Linden, A. (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol.* **162**, 2347-2352.

Lambrecht, B. N., Hoogsteden, H. C., and Pauwels, R. A. (2001) Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **124**, 432-446.

Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K., and Notkins, A. L. (1996) IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 6367-6370.

Lechmann, M., Krooshoop, D. J., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C. G., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001) The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1813-1821.

Leiter, E. H., Prochazka, M., and Coleman, D. L. (1987) The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am. J. Pathol.* **128**, 380-383.

Leslie, D., Lipsky, P., and Notkins, A. L. (2001) Autoantibodies as predictors of disease. *J. Clin. Invest* **108**, 1417-1422.

Lettau, M., Paulsen, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2009) FasL expression and reverse signalling. *Results Probl. Cell Differ.* **49**, 49-61.

Lettesjo, H., Ridderstad, A., and Moller, E. (1997) IgG2b inducing factor from rheumatoid arthritis synovial fluid synergizes with transforming growth factor-beta in promoting IgG2b antibody production in mouse B lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **45**, 50-54.

Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U., and Roncarolo, M. G. (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 263-276.

## Literaturverzeichnis

Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L. A. (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271-2279.

Liu, Y. J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.

Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445-449.

Lyons, J. A., San, M., Happ, M. P., and Cross, A. H. (1999) B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3432-3439.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071-5079.

MacDonald, A. S. and Maizels, R. M. (2008) Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J. Exp. Med.* **205**, 13-17.

Machen, J., Harnaha, J., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2004) Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 4331-4341.

Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., and Jonuleit, H. (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 477-483.

Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* **29**, 1-13.

Maldonado, R. A. and von Andrian, U. H. (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* **108**, 111-165.

Many, M. C., Maniratunga, S., and Denef, J. F. (1996) The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **104 Suppl 3**, 17-20.

## Literaturverzeichnis

Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341.

Matsushita, S. and Higashi, T. (2008) Human Th17 cell clones and natural immune responses. *Allergol. Int.* **57**, 135-140.

Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M., and Tedder, T. F. (2008) Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* **118**, 3420-3430.

Mauri, C. and Ehrenstein, M. R. (2008) The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* **29**, 34-40.

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145.

Mehers, K. L. and Gillespie, K. M. (2008) The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* **88**, 115-129.

Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M. B. (2002) Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* **195**, 15-21.

Moser, M. and Murphy, K. M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199-205.

Muller-Eberhard, H. J. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 321-347.

Neacsu, C., Ciobanu, C., Barbu, I., Toader, O., Szegli, G., Kerek, F., and Babes, A. (2010) Substance MCS-18 isolated from *Helleborus purpurascens* is a potent antagonist of the capsaicin receptor, TRPV1, in rat cultured sensory neurons. *Physiol. Res.* **59**, 289-298.

Nica, S., Stanescu, L., and Krejci, G. (2005) A randomised doubleblind phase II study with injection containing MCS-18 as active substance in 3+1 doses versus placebo in the treatment of painful shoulder periarthritis. *Clin. Trial Rep.* 1-216.



## Literaturverzeichnis

Nikolic, T., Geutskens, S. B., van, R. N., Drexhage, H. A., and Leenen, P. J. (2005) Dendritic cells and macrophages are essential for the retention of lymphocytes in (peri)-insulitis of the nonobese diabetic mouse: a phagocyte depletion study. *Lab Invest* **85**, 487-501.

Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., and Littman, D. R. (1988) Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* **336**, 79-81.

Novak, J. and Novakova, L. (2012) Prevention and treatment of type 1 diabetes mellitus by the manipulation of invariant natural killer T cells. *Clin. Exp. Med.*

O'Garra, A. and Murphy, K. M. (1996) Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chem. Immunol.* **63**, 1-13.

O'Garra, A. and Murphy, K. M. (2009) From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat. Immunol.* **10**, 929-932.

Olefsky, J. M. and Glass, C. K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 219-246.

Palmer, J. P. (1987) Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab. Rev.* **3**, 1005-1015.

Paust, S., Lu, L., McCarty, N., and Cantor, H. (2004) Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10398-10403.

Penna, G. and Adorini, L. (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* **164**, 2405-2411.

Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. (2004) Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.* **16**, 81-88.

Podack, E. R. and Tschopp, J. (1984) Membrane attack by complement. *Mol. Immunol.* **21**, 589-603.

Pope, M. (2003) Dendritic cells as a conduit to improve HIV vaccines. *Curr. Mol. Med.* **3**, 229-242.

## Literaturverzeichnis

- Prochazka, M., Serreze, D. V., Worthen, S. M., and Leiter, E. H. (1989) Genetic control of diabetogenesis in NOD/Lt mice. Development and analysis of congenic stocks. *Diabetes* **38**, 1446-1455.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. (2001) Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* **22**, 41-47.
- Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y., and Germain, R. N. (2006) Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* **312**, 1672-1676.
- Reis e Sousa (2004) Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* **16**, 27-34.
- Renz-Polster, B. J. (2001) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 2. Auflage, Urban & Fischer.
- Reth, M. (1992) Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 97-121.
- Robertson, M. J. (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 173-183.
- Robles, D. T. and Eisenbarth, G. S. (2001) Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J. Autoimmun.* **16**, 355-362.
- Roncarolo, M. G. and Levings, M. K. (2000) The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 676-683.
- Roost, H. P., Bachmann, M. F., Haag, A., Kalinke, U., Pliska, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1995) Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1257-1261.
- Rosmalen, J. G., Leenen, P. J., Katz, J. D., Voerman, J. S., and Drexhage, H. A. (1997) Dendritic cells in the autoimmune insulitis in NOD mouse models of diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 291-294.
- Sakaguchi, S., Toda, M., Asano, M., Itoh, M., Morse, S. S., and Sakaguchi, N. (1996) T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **9**, 211-220.

## Literaturverzeichnis

Salio, M., Cella, M., Suter, M., and Lanzavecchia, A. (1999) Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3245-3253.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.

Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int. Immunol.* **6**, 665-669.

Schifferli, J. A., Ng, Y. C., and Peters, D. K. (1986) The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* **315**, 488-495.

Schroeder, H. W., Jr. and Cavacini, L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41-S52.

Schuler, G. and Steinman, R. M. (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* **161**, 526-546.

Schuurhuis, D. H., Fu, N., Ossendorp, F., and Melief, C. J. (2006) Ins and outs of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **140**, 53-72.

Schwartz, R. H. (2003) T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305-334.

Seddon, B. and Mason, D. (2000) The third function of the thymus. *Immunol. Today* **21**, 95-99.

Seissler, J., de Sonnaville, J. J., Morgenthaler, N. G., Steinbrenner, H., Glawe, D., Khoo-Morgenthaler, U. Y., Lan, M. S., Notkins, A. L., Heine, R. J., and Scherbaum, W. A. (1998) Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* **41**, 891-897.

Sell, S., Park, A. B., and Nordin, A. A. (1970) Immunoglobulin classes of antibody-forming cells in mice. I. Localized hemolysis-in-agar plaque-forming cells belonging to five immunoglobulin classes. *J. Immunol.* **104**, 483-494.

Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A., Leiter, E. H., and Shultz, L. D. (1996) B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-

## Literaturverzeichnis

mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J. Exp. Med.* **184**, 2049-2053.

Shimomura, Y., Mizoguchi, E., Sugimoto, K., Kibe, R., Benno, Y., Mizoguchi, A., and Bhan, A. K. (2008) Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int. Immunol.* **20**, 729-737.

Shinomiya, M., Nadano, S., Shinomiya, H., and Onji, M. (2000) In situ characterization of dendritic cells occurring in the islets of nonobese diabetic mice during the development of insulinitis. *Pancreas* **20**, 290-296.

Shortman, K. (2000) Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 161-165.

Sprong, T., Moller, A. S., Bjerre, A., Wedege, E., Kierulf, P., van der Meer, J. W., Brandtzaeg, P., van, D. M., and Mollnes, T. E. (2004) Complement activation and complement-dependent inflammation by *Neisseria meningitidis* are independent of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **72**, 3344-3349.

Spycher, M. O., Spycher-Burger, M., Spath, P. J., and Burckhardt, J. J. (1991) Human serum induced opsonization of immunoglobulin G-coated polystyrene microspheres with complement components C3 and C4 as measured by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **145**, 83-92.

Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685-711.

Steinman, R. M. and Hemmi, H. (2006) Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**, 17-58.

Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., and Mellman, I. (1999) Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum. Immunol.* **60**, 562-567.

Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (2002) Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 351-358.

Steinman, R. M. and Witmer, M. D. (1978) Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5132-5136.

Steinman, R. M. and Young, J. W. (1991) Signals arising from antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 361-372.

## Literaturverzeichnis

Steptoe, R. J., Ritchie, J. M., and Harrison, L. C. (2002) Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **168**, 5032-5041.

Stimac, R., Kerek, F., and Apell, H. J. (2003) Macrocyclic carbon suboxide oligomers as potent inhibitors of the Na,K-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 327-329.

Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R., and Jansson, L. (1998) B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 521-526.

Taams, L. S. and Akbar, A. N. (2005) Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **293**, 115-131.

Taguchi, O., Kojima, A., and Nishizuka, Y. (1985) Experimental autoimmune prostatitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* **60**, 123-129.

Taguchi, O., Nishizuka, Y., Sakakura, T., and Kojima, A. (1980) Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **40**, 540-553.

Takiishi, T., Gysemans, C., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2010) Vitamin D and diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 419-46, table.

Tang, Q. and Bluestone, J. A. (2008) The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239-244.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Bluestone, J. A. (2003) Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **171**, 3348-3352.

Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Dorner, T. (2008) Plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 162-169.

Terness, P., Dufter, C., Linke, S., Kerek, F., Jung, T., Watzlik, A., and Opelz, G. (1999) HP12: a highly purified Helleborus species extract strongly potentiates the T-cell suppressive effect of cyclosporine A. *Transplant. Proc.* **31**, 1174-1175.

Thayer, T. C., Wilson, S. B., and Mathews, C. E. (2010) Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 541-561.

## Literaturverzeichnis

Thery, C. and Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45-51.

Tian, J., Lehmann, P. V., and Kaufman, D. L. (1994) T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J. Exp. Med.* **180**, 1979-1984.

Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D. L. (2001) Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **167**, 1081-1089.

Tisch, R. and McDevitt, H. (1996) Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**, 291-297.

Tritt, M., Sgouroudis, E., d'Hennezel, E., Albanese, A., and Piccirillo, C. A. (2008) Functional waning of naturally occurring CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes* **57**, 113-123.

van Belle, T. L., Coppieters, K. T., and von Herrath, M. G. (2011) Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* **91**, 79-118.

Van, P. L., Ibraghimov, A., and Abbas, A. K. (1996) The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* **4**, 321-328.

Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008) How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523-532.

von Boehmer (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 338-344.

Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C., and Kerr, J. F. (1988) Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **13**, 18-54.

Walport, M. J. (2001) Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1058-1066.

Wan, Y. Y. and Flavell, R. A. (2006) The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **212**, 114-130.

## Literaturverzeichnis

Weaver, D. J., Jr., Liu, B., and Tisch, R. (2001) Plasmid DNAs encoding insulin and glutamic acid decarboxylase 65 have distinct effects on the progression of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **167**, 586-592.

Weenink, S. M. and Gautam, A. M. (1997) Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 69-81.

Wentworth, B. M., Schaefer, I. M., Villa-Komaroff, L., and Chirgwin, J. M. (1986) Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J. Mol. Evol.* **23**, 305-312.

Wicker, L. S., Miller, B. J., and Mullen, Y. (1986) Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* **35**, 855-860.

Wicker, L. S., Todd, J. A., and Peterson, L. B. (1995) Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 179-200.

Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F. D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M., and Brunkow, M. E. (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18-20.

Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001) Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**, 3376-3382.

Wu, L. and Liu, Y. J. (2007) Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. **26**, 741-750.

Yang, X. O., Chang, S. H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y. H., Schluns, K. S., Broaddus, R. R., Zhu, Z., and Dong, C. (2008) Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* **205**, 1063-1075.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., and Mori, T. (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J. Biochem.* **147**, 781-792.

Zal, T., Volkmann, A., and Stockinger, B. (1994) Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* **180**, 2089-2099.

## Literaturverzeichnis

Zheng, Y. and Rudensky, A. Y. (2007) Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* **8**, 457-462.

Zhou, L. J., Schwarting, R., Smith, H. M., and Tedder, T. F. (1992) A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* **149**, 735-742.

Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* **154**, 3821-3835.

Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1996) CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2588-2592.

Zhu, J. and Paul, W. E. (2010) Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* **238**, 247-262.

Ziegler, S. F. (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 209-226.

Zinser, E., Lechmann, M., Golka, A., Lutz, M. B., and Steinkasserer, A. (2004) Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *J. Exp. Med.* **200**, 345-351.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das immunmodulatorische Potential von MCS-18 *in vitro* und *in vivo* im NOD-Mausmodell untersucht. Bei MCS-18 handelt es sich um eine natürliche Substanz, die aus dem Purpur-Nieswurz (*Helleborus purpurascens*) aus der Gattung der Christrosen isoliert wird.

*In vitro* wurde die immunmodulatorische Kapazität von MCS-18 auf murine Dendritische Zellen (DZ), isoliert aus dem Knochenmark von C57BL/6- und NOD-Mäusen, getestet. Die DZ wurden unterschiedlich stimuliert (LPS, TNF- $\alpha$ , LPS+anti-CD40) und in Ab- bzw. Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von MCS-18 (50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml) inkubiert. Mit Hilfe von FACS-Analysen wurde die Expression von - für reife DZ typischen - Oberflächenmolekülen bestimmt. Es zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit MCS-18 zu einer konzentrationsabhängigen Herabregulierung der Oberflächenmoleküle CD40, CD83 (C57BL/6-DZ) und CD80, CD86, CD40 sowie CD25 (NOD-DZ) kommt. Des Weiteren wurde die Funktionalität der mit MCS-18 behandelten DZ in einer gemischten Leukozyten-Reaktion (MLR) untersucht. Die stimulatorische Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, war bei den mit MCS-18 inkubierten DZ reduziert. Inwieweit MCS-18 auch eine Wirkung auf die Freisetzung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und MCP-1 hat, wurde mit Hilfe eines CytometricBead Arrays (CBA) bzw. ELISAs analysiert. Hierbei konnte bei den mit MCS-18 inkubierten DZ für alle Zytokine eine Abnahme hinsichtlich ihrer Sekretion festgestellt werden. Außerdem wurde das Proliferationsverhalten sowie die Immunglobulin-Sekretion von B-Zellen nach der Inkubation mit MCS-18 analysiert. Interessanterweise reduzierte MCS-18 die B-Zell-Proliferation und die Immunglobulin-Sekretion der mit MCS-18 inkubierten B-Zellen.

*In vivo* wurde MCS-18 im non-obese diabetic-Mausmodell (NOD-Mausmodell) eingesetzt. Dieses Tiermodell dient seit über 30 Jahren der Erforschung genetischer

## Zusammenfassung

und pathogenetischer Grundlagen des humanen *Diabetes mellitus* Typ 1 (T1D). Noch immer besteht ein hoher medizinischer Bedarf an neuen Therapieansätzen, um den T1D zu verhindern bzw. zu behandeln. Aufgabe dieser Arbeit war es, die Wirkung von MCS-18 in NOD-Mäusen genauer zu untersuchen. Den NOD-Mäusen wurde MCS-18 in der 8. bzw. 8. und 12. Lebenswoche prophylaktisch intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Ab der 10. Lebenswoche wurde einmal wöchentlich die Glukosekonzentration des Harns mittels Teststäbchen bestimmt. Bei diesem Vorgehen konnte gezeigt werden, dass MCS-18 in der Lage ist, das diabetesfreie Überleben im NOD-Mausmodell zu erhöhen. In der Tiergruppe, die mit MCS-18 während der 8. und 12. Lebenswoche behandelt wurde, zeigten 70% der Tiere ein diabetesfreies Überleben bis in die 30. Woche, während im Gegensatz dazu unter den unbehandelten Tieren weniger als 10% diabetesfrei blieben. Die Pankreata der diabetesfreien MCS-18 behandelten NOD-Mäuse sowie der unbehandelten Kontrolltiere wurden mRNA-Analysen unterzogen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrolltieren konnte bei den MCS-18 behandelten Mäusen eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression für Insulin 1, Insulin 2, sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 nachgewiesen werden. Für die IFN- $\gamma$  mRNA Expression zeigte sich eine signifikante Reduktion bei den MCS-18 behandelten Mäusen im Vergleich zu den diabetischen Kontrolltieren. Zudem konnten durch FACS-Analysen in den Pankreata der MCS-18 behandelten Tiere signifikant mehr Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden als bei den unbehandelten Kontrolltieren. In den Milzen und Pankreatischen Lymphknoten konnte keine Veränderung in der Population der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Um eine Aussage über den morphologischen Zustand der Langerhans'schen Inseln zu bekommen, wurden die Pankreata der Mäuse immunhistologisch untersucht. Bei den MCS-18 behandelten NOD-Mäusen sowie unbehandelten Kontrollmäusen konnte eine Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig konnten in den Langerhans'schen Inseln der MCS-18 behandelten NOD-Mäuse aber auch vermehrt Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Abschließend wurden isolierte Milzzellen auf ihre Peptid-spezifische, IFN- $\gamma$  produzierende Fähigkeit mittels Elispot-Assay

## Zusammenfassung

untersucht. Durch die Peptide Insulin und NRP-A7 wurden die isolierten Milzzellen stimuliert. Die durch NRP-A7 hervorgerufene T-Zell-Aktivierung und damit verbundenen IFN- $\gamma$  Sekretion war bei den Zellen aus den MCS-18 behandelten Mäusen, im Vergleich zu jenen aus den Kontrolltieren, signifikant reduziert.

.

## 7 Summary

In the present study the immune-modulatory potential of MCS-18 was examined *in vitro* and *in vivo* using the NOD-mouse model. MCS-18 is a natural product isolated from *Helleborus purpurascens* (i.e. Christmas rose).

The immune-modulatory capacity of MCS-18 was tested on murine BM-DC of C57BL/6- and NOD-mice *in vitro*. The DC were cultured with different stimuli (LPS, TNF- $\alpha$ , LPS+anti-CD40) and incubated in the presence of different concentrations of MCS-18 (50 or 100  $\mu$ g/ml) or were left untreated (mock). FACS analyses were performed to measure the expression of functionally important surface molecules typical for the matured DC such as CD40, CD83, CD80, CD86 or CD25. Interestingly, MCS-18 inhibited the expression of DC-specific molecules and lead to an impaired T-cell stimulation capacity. Furthermore, NOD-DC cultured in the presence of MCS-18 showed a clear reduction in their expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 as well as MCP-1. In addition, MCS-18 also reduced B-cell proliferation and immunoglobulin production.

*In vivo* MCS-18 was tested in NOD mice, a model for type 1 diabetes. There is still a need for new therapies in order to prevent or treat type I diabetes. In the context of this doctoral thesis it can be shown that MCS-18 is able to increase diabetes free survival using the NOD-mouse model. In those animals that have been treated with MCS-18 at the age of 8 and 12 weeks 70% showed a diabetes free survival at week 30. In contrast, in untreated animals less than 10% were free of diabetes. As one possible mechanism for the protective function of MCS-18 in this animal model, the percentage of regulatory T cells present in spleen, pancreatic lymph node and pancreas was analysed by FACS. In pancreas of MCS-18 treated, animals, the CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cell population was significantly enhanced in comparison to mock treated diabetic animals, whereas the ratio of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in spleen and pancreatic lymph node was comparable to MCS-18 treated and mock animals. To

## Summary

confirm these findings, real-time PCR analyses of the pancreata were performed. For this, mRNA copy numbers specific for insulin 1, insulin 2, IFN- $\gamma$  and Foxp3-mRNA were determined. Statistically significant higher levels of insulin 1 and insulin 2 and Foxp3 specific transcripts were detected in MCS-18 treated animals in comparison to mock treated animals. In contrast, IFN- $\gamma$  levels were decreased in the MCS-18 treatment group. In order to further support these findings, serial sections of pancreatic tissue from MCS-18 treated animals and mock treated animals were stained with antibodies specific for CD4, CD8 und Foxp3. MCS-18 treated animals were examined at the age 30 weeks. Mock treated control mice with a diagnosed glucosuria showed a strong infiltration of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Moreover, Foxp3<sup>+</sup> T cells were rare. Although MCS-18 treated animals had a marked periinsulitis, CD4<sup>+</sup> as well as CD8<sup>+</sup> T cells were present. These animals manifested a strongly preserved insulin expression in comparison to mock treated animals. Furthermore, MCS-18 treated animals showed an increased number of Foxp3<sup>+</sup> cells indicating the presence of regulatory T-cells. The influence of MCS-18 treatment on the Th1-response associated cytokine secretion (i.e. IFN- $\gamma$ ) after stimulation with type 1 diabetes auto-antigens (insulin B chain and NRP-A7) was investigated using ELISPOT assays. Mock treated animals showed a strong IFN- $\gamma$  secretion in response to the auto-antigen insulin and even more to NRP-A7. In contrast, MCS-18 treatment showed a trend towards a reduction in IFN- $\gamma$  secretion upon stimulation with insulin 1 and even stronger after the stimulation with NRP-A7. These findings suggest a suppressive effect on cytotoxic Th-1 cells, e.g. diabetogenic CD8<sup>+</sup> T cells, in MCS-18 treated animals.

## 8 Veröffentlichungen

**Wissenschaftliche Originalveröffentlichungen während meines Promotionsstudiums:**

1. Zinser E., Rössner S., Littmann L., Pangratz N., Schuler G., Steinkasserer A. (2012). The IL-2 diphtheria toxin fusion protein denileukin diftotoxin modulates the onset of diabetes in female nonobese diabetic animals in a time-dependent manner and breaks tolerance in male nonobese diabetic animals. *J. Immunol.* 189(3):1173-1118.
2. Seifarth C., Littmann L., Resheq Y., Rössner S., Goldwisch A., Pangratz N., Kerek F., Steinkasserer A., Zinser E. (2011). MCS-18, a novel natural plant product prevents autoimmune diabetes. *Immunol. Lett.* 139(1-2):58-67.
3. Zinser E., Rössner S., Littmann L., Lüftenegger D., Schubert U., Steinkasserer A. (2009). Inhibition of the proteasome influences murine and human dendritic cell development in vitro and in vivo. *Immunobiology* 214(9-10):843-851.
4. Littmann L., Rössner S., Kerek F., Steinkasserer A., Zinser E. (2008). Modulation of murine bone marrow-derived dendritic cells and B-cells by MCS-18 a natural product isolated from *Helleborus purpurascens*. *Immunobiology* 213(9-10):871-878.
5. Röner S., Zinser E., Menges M., Wiethe C., Littmann L., Hänig J., Steinkasserer A., Lutz MB. (2008). Minor role of bystander tolerance to fetal calf serum in a peptide-specific dendritic cell vaccine model against autoimmunity: comparison with serum-free cultures. *J. Immunother.* 31(7):656-664.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Alexander Steinkasserer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und die gute Betreuung während meiner Zeit an der Hautklinik der Universität Erlangen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Frau Dr. Elisabeth Zinser, liebe Lisa ich möchte mich ganz herzlich für die perfekte Betreuung „an der Front“ bedanken. Danke für dein ständiges „immer-da-sein“ und deine fachliche Unterstützung.

Vielen Dank an meine 007-Mitstreiter Alexandros Theodoridis und Nadine Pangratz für die vielen beantworteten Fragen und das tolle Arbeitsklima.

Danke Susa für die schöne Zeit im Mauslabor und dein unermüdliches Beantworten aller Fragen sowie für die Weitergabe deines Wissens.

Ich danke meinen Eltern und Patrick für die Unterstützung während der Promotion. Ganz besonders meiner Mama. Liebe Mama, vielen Dank für die Geduld und die liebevolle Betreuung von Emil. Ohne Dich wäre das „Werk“ nie fertiggestellt worden.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6136-4



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 1 3 6 4